

**Interaktionen des Flavonoids Flavon mit  
dem P-glykoprotein 170 beeinflussen  
Parameter der Tumorentstehung *in vitro*  
und *in vivo***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaft  
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Dipl. oec. troph. Marco Schumacher  
aus Grevenbroich

2014

Dekan: Prof. Dr. H. Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Wenzel

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Clauss

# Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.

---

Datum, Ort

---

Unterschrift

# Danksagung

Hier möchte ich mich bei Allen bedanken, die während meiner Tätigkeit am Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herr **Prof. Dr. Uwe Wenzel** hat sowohl durch die Überlassung des spannenden Themas und seiner wissenschaftlichen Betreuung wie auch durch den gewährten Freiraum und die hervorragenden Arbeitsbedingungen an seinem Institut maßgeblichen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Clauss** danke ich für die Vertretung meiner Dissertation am Fachbereich 08, Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität.

Herr **Dr. Michael Boll** und Frau **Eva Czynski** standen mir immer und jederzeit mit Rat und Tat bezüglich meiner Arbeit zur Seite.

Frau **Dr. Sabine Kuntz** danke ich für ihre Unterstützung bei meinen ersten Schritten mit der Caco-2 Zellkultur.

Frau **Dr. Doris Oesterle** und Frau **Carmen Spiller** danke ich für die Betreuung der Versuchstiere und die anschließende Probengewinnung am Helmholtz-Zentrum München.

Herrn **Prof. Dr. Thomas Linn, Doris Erbs, Birte Hußmann** und **Gundula Hertl** danke ich für die Möglichkeit in der Poliklinik meine Gewebeschnitte anfertigen zu können.

„Meinen“ Studentinnen **Daniela Popovic, Anke Hertrampf, Susanne Holzhauser, Annette Rossmann, Anja Hautzinger** und **Barbara Lies** danke ich für die tolle Zeit und die hervorragende Zusammenarbeit innerhalb und außerhalb des Instituts.

Die gesamte Arbeitsgruppe um Herrn **PD Dr. Ralf Pätzold** hat durch die Schaffung vieler schöner Stunden neben der Arbeit zu einem ganz unvergesslichen Klima auch in unserem Institut beigetragen.

Herr **Prof. Dr. Ernst Petzinger** war so freundlich sich die Zeit als Betreuer meines Dissertationsthemas im Graduiertenkolleg „International Giessen Graduate School for the Life Sciences“ zu nehmen.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Freundin **Andrea** bedanken, die durch ihre Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Ausdauer und Geduld mit mir maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Danke, dass du für mich da bist.

# Veröffentlichungen

## *Publikationen*

**Schumacher M, Hautzinger A, Rossmann A, Holzhauser S, Popovic D, Hertrampf A, Kuntz S, Boll M, Wenzel U (2010).** Chrysin blocks topotecan-induced apoptosis in Caco-2 cells in spite of inhibition of ABC-transporters. *Biochem. Pharmacol.* 80:471–9.

**Kaminski BM, Weigert A, Brüne B, Schumacher M, Wenzel U, Steinhilber D, Stein J, Ulrich S (2011).** Sulforaphane potentiates oxaliplatin-induced cell growth inhibition in colorectal cancer cells via induction of different modes of cell death. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67:1167–78.

**Schumacher M, Hautzinger A, Rossmann A, Holzhauser S, Popovic D, Hertrampf A, Oesterle D, Spiller C, Boll M, Wenzel U (2011).** Potential role of P-gp for flavone-induced diminished apoptosis and increased adenoma size in the small intestine of APC(min/+) mice. *Cancer Invest.* 29:396–404.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Erklärung.....</b>	<b>I</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>II</b>
<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>IV</b>
<b>Bilderverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>1     Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1   Das colorektale Karzinom – Epidemiologie, Entstehung und Entwicklung ..	1
1.2 $\beta$ -Catenin – ein zentraler Baustein der Zelladhäsion und des wnt-Signalweges.....	3
1.3   Apoptose und colorektale Karzinogenese.....	5
1.3.1   Regulation der Apoptose .....	5
1.3.2   Fehlregulation der Apoptose bei colorektalen Karzinomen.....	8
1.4   Die multidrug resistance-Problematik in der Tumorthherapie .....	9
1.4.1   Phosphoglykoprotein-170 (P-gp) .....	10
1.4.2   Multidrug-resistance-associated protein-2 (MRP-2).....	14
1.4.3   Breast cancer resistance protein (BCRP) .....	14
1.5   Flavonoide – Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in der Krebstherapie.....	16
<b>2     Zielsetzung .....</b>	<b>20</b>
<b>3     Methoden.....</b>	<b>22</b>
3.1   Kultivierung der Caco-2 Zelllinie .....	22
3.2   APC <sup>min/+</sup> -Maus.....	23
3.3   Nachweis der Expression der ABC-Transporter mittels Western Blot .....	24
3.3.1   Gewinnung von Membranen und Zytosol aus Caco-2 Zellen .....	24
3.3.2   Gewinnung von Membranen aus Darmproben von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	25
3.3.3   Methoden der Analyse .....	25
3.3.3.1   SDS-Gelelektrophorese .....	25
3.3.3.2   Western Blotting.....	26
3.4   Immunfluoreszenznachweis von $\beta$ -Catenin und ABC-Transportern .....	28
3.4.1   Vorbereitung der Caco-2 Zellen für die immunhistochemische Darstellung von $\beta$ -Catenin .....	28
3.4.2   Vorbereitung der intestinalen Gewebeschnitte von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen zur immunhistochemischen Darstellung von $\beta$ -Catenin, P-gp, MRP-2 und BCRP .....	28

3.4.3	Immunhistochemischer Nachweis von $\beta$ -Catenin, P-gp, MRP-2 und BCRP.....	29
3.4.3.1	Nachweis von $\beta$ -Catenin in Caco-2 Zellen .....	29
3.4.3.2	Immunhistochemie in APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	30
3.5	Charakterisierung der ABC-Transporteraktivität .....	31
3.6	Bestimmung von Apoptose-Parametern .....	32
3.6.1	Bestimmung der Caspase-Aktivität <i>in vitro</i> und aktiver Caspase <i>in vivo</i> ....	32
3.6.1.1	Nachweis der Aktivität der Caspasen-3 und -8 in Caco-2 Zellen .....	32
3.6.1.2	Nachweis aktivierter Caspase in intestinalen Zellen von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	33
3.6.2	DNA-Fragmentierung.....	33
3.7	Proliferation.....	34
3.8	Differenzierung .....	34
3.9	Statistische Auswertung und graphische Darstellung .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
4.1	Flavonoide als Inhibitoren der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP in Caco-2 Zellen .....	36
4.1.1	Dosis-Wirkungs-Berechnungen von Flavon und Chrysin bezüglich der Akkumulation von Substraten des P-gp, MRP-2 und BCRP .....	36
4.1.2	Nachweis einer spezifischen Interaktion der beiden Flavonoide Flavon und Chrysin mit den ABC-Transportern P-gp, MRP-2 und BCRP .....	38
4.1.3	Expressionsanalyse der Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP in Caco-2 Zellen .....	42
4.2	Einfluss der Flavonoide Flavon und Chrysin auf zentrale Parameter der Karzinogenese.....	45
4.2.1	Proliferation und Differenzierung .....	45
4.2.2	Flavon und Chrysin inhibieren potent die Topotecan-induzierte Apoptose .....	47
4.2.3	Flavon und Chrysin inhibieren die Topotecan-vermittelte Aktivierung der Caspase-3 und der Caspase-8 .....	49
4.3	Stabilisierung des zytosolischen $\beta$ -Catenin durch Flavon und Chrysin .....	51
4.3.1	Flavon und Chrysin inhibieren die Topotecan-induzierte $\beta$ -Catenin Spaltung.....	51
4.3.2	Flavon und Chrysin fördern die zytosolische $\beta$ -Catenin Anreicherung.....	52
4.4	Flavon erhöht die Anzahl an Adenomen im Dünndarm von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen.....	55
4.5	APC <sup>min/+</sup> -Mäuse entwickeln vermehrt große Adenome nach Flavonbehandlung .....	56
4.6	Nachweis der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP im Intestinaltrakt von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen.....	58
4.6.1	P-gp Nachweis im Intestinum der APC <sup>min/+</sup> -Maus .....	58
4.6.2	Immunhistochemischer Nachweis von MRP-2.....	59
4.6.3	Immunhistochemischer Nachweis von BCRP .....	61
4.7	Inhibierung der Apoptose durch Flavon im Jejunum und Ileum der APC <sup>min/+</sup> -Maus.....	62



4.7.1	Flavon reduziert die Anzahl Caspase-3 aktiver Zellen .....	62
4.7.2	Die Lokalisierung von $\beta$ -Catenin in der APC <sup>min/+</sup> -Maus wird durch Flavon nicht beeinflusst .....	64
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
5.1	Inhibierung der ABC-Transporteraktivität durch Flavon und Chrysin .....	66
5.2	Wechselwirkungen der Flavonoide Flavon und Chrysin mit ABC-Transportern der apikalen Enterozytenmembran .....	68
5.3	Einfluss von Flavon und Chrysin auf die Proliferation und die Differenzierung von Caco-2 Zellen.....	70
5.4	Einfluss von Flavon und Chrysin auf die Apoptose in Caco-2 Zellen.....	71
5.5	Auswirkungen einer Flavon- und Chrysinbehandlung auf die $\beta$ -Catenin Stabilität und die zelluläre Lokalisation .....	72
5.6	Die APC <sup>min/+</sup> -Maus als Modell der colorektalen Karzinogenese.....	74
5.6.1	Einfluss von Flavon auf die Adenomlast im Intestinum der APC <sup>min/+</sup> -Maus	74
5.6.2	Einfluss von Flavon auf die Expression der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP im Intestinum der APC <sup>min/+</sup> -Maus .....	75
5.6.3	Einfluss von Flavon auf die Apoptose im Intestinum der APC <sup>min/+</sup> -Maus ...	77
5.6.4	Beurteilung der APC <sup>min/+</sup> -Maus als geeignetes Modell der colorektalen Karzinogenese .....	78
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>103</b>
A.1	Materialien .....	103
A.1.1	Chemikalien .....	103
A.1.2	Puffer und Lösungen .....	104
A.1.3	Geräte.....	106
A.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	106

# Bilderverzeichnis

Abb. 1.1:	Adenom-Karzinom-Sequenz (nach [12,13,14]) .....	2
Abb. 1.2:	Positionen von $\beta$ -Catenin im wnt-Signalweg (nach [16]) .....	4
Abb. 1.3:	Apoptose – extrinsischer und intrinsischer Signalweg (nach [33]) ....	7
Abb. 1.4:	Membrantopologie von P-gp (nach [60]) .....	10
Abb. 1.5:	Transport von Lipiden durch ABC-Transporter über die Zellmembran (Flip-Flop-Mechanismus; nach [52]) .....	12
Abb. 1.6:	Membrantopologie von MRP-2 (nach [60]).....	14
Abb. 1.7:	Membrantopologie von BCRP (nach [60]) .....	15
Abb. 1.8:	Strukturformeln der Flavonoide .....	16
Abb. 4.1:	Modulation der P-gp Aktivität durch Flavonoide .....	36
Abb. 4.2:	Dosisabhängige Inhibierung der ABC-Transporter P-gp, BCRP und MRP-2 durch Flavon und Chrysin .....	37
Abb. 4.3:	Modulation der Aktivität der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP durch spezifische Inhibitoren sowie Flavon und Chrysin .....	39
Abb. 4.4:	Flavon und Chrysin erhöhen die Topotecankonzentration in Caco-2 Zellen .....	41
Abb. 4.5:	Expressionsanalyse von P-gp nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination .....	42
Abb. 4.6:	Expressionsanalyse von MRP-2 nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination .....	43
Abb. 4.7:	Expressionsanalyse von BCRP nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination .....	44
Abb. 4.8:	Erhöhte Topotecanakkumulation in Caco-2 Zellen nach 48stündiger Inkubation mit Flavon und Chrysin .....	45
Abb. 4.9:	Darstellung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen .....	46
Abb. 4.10:	Darstellung des Differenzierungsgrades von Caco-2 Zellen .....	47
Abb. 4.11:	Nachweis der Topotecan-induzierten Apoptose in Caco-2 Zellen mittels Zellkernfärbung .....	48
Abb. 4.12:	Dosisabhängige Reduktion der Topotecan-vermittelten Apoptose durch Flavon und Chrysin .....	49

Abb. 4.13:	Aktivität der Caspasen-3 und -8 nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination .....	50
Abb. 4.14:	Detektion von $\beta$ -Catenin Spaltprodukten nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination .....	52
Abb. 4.15:	Immunhistochemischer Nachweis der $\beta$ -Catenin Lokalisation in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Flavon, Topotecan und deren Kombination .....	53
Abb. 4.16:	Immunhistochemischer Nachweis der $\beta$ -Catenin Lokalisation in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Chrysin, Topotecan und deren Kombination .....	54
Abb. 4.17:	Flavon erhöht die Anzahl der Adenome im Dünn- und Dickdarm der APC <sup>min/+</sup> -Maus .....	56
Abb. 4.18:	Größenveränderung der Adenome nach Flavonbehandlung .....	57
Abb. 4.19:	Exprimierte P-gp Menge im Intestinaltrakt der APC <sup>min/+</sup> -Maus .....	58
Abb. 4.20:	Immunhistochemischer MRP-2 Nachweis in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	59
Abb. 4.21:	Exprimierte MRP-2 Menge im Intestinaltrakt der APC <sup>min/+</sup> -Maus .....	60
Abb. 4.22:	Immunhistochemischer BCRP Nachweis in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	61
Abb. 4.23:	Exprimierte BCRP Menge im Intestinaltrakt der APC <sup>min/+</sup> -Maus .....	62
Abb. 4.24:	Immunhistochemischer Nachweis Caspase-aktiver Zellen in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	63
Abb. 4.25:	Anzahl Caspase-aktiver Zellen in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	64
Abb. 4.26:	Immunhistochemischer Nachweis von $\beta$ -Catenin in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC <sup>min/+</sup> -Mäusen .....	65

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Überblick über die untersuchten ABC-Transporter.....	13
Tab. 3.1:	Zusammensetzung des Caco-2 Kulturmediums.....	22
Tab. 3.2:	Caco-2 Zellen: Aussaat für Stammerhaltung und für Experimente .	23
Tab. 3.3:	Zusammensetzung der Acrylamidgele .....	26
Tab. 3.4:	In Western Blot-Experimenten verwendete Antikörper.....	27
Tab. 3.5:	Lösungsmittelkette zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte .....	29
Tab. 3.6:	Immunhistochemisch eingesetzte Antikörper .....	30
Tab. 3.7:	Konzentrationen der für die Bestimmung der ABC-Transporteraktivität verwendeten Farbstoffe, Effektoren und Inhibitoren .....	32
Tab. 9.1:	Verwendete Chemikalien .....	103
Tab. 9.2:	Verwendete Puffer und Lösungen.....	104
Tab. 9.3:	Verwendete Geräte .....	106
Tab. 9.4:	Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	106

# Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
AKS	Adenom-Karzinom-Sequenz
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AP	Alkalische Phosphatase
APAF	Apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor
APC	Adenomatöse <i>Polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCRP	Breast cancer resistance protein
BSA	Bovines Serumalbumin
$\beta$ -Cat	$\beta$ -Catenin
CK	Caseinkinase
COX	Cyclooxygenase
CRK	colorektales Karzinom
DEA	Diethanolamin
DED	death effector domain
DISC	death inducing signaling complex
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos Phosphatpuffer
Dsh	Dishevelled
DTT	Dithiothreit
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emissionswellenlänge
Ex	Extinktionswellenlänge

EZR	extrazellulärer Raum
$\Delta F$	Fluoreszenzanstieg
FADD	Fas associated death domain
FAP	familiäre adenomatöse <i>Polyposis coli</i>
FKS	fötales Kälberserum
FTC	Fumitremorgin c
Fz	Frizzled
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSK	Glykogensynthasekinase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IZR	intrazellulärer Raum
k-ras	Kirsten rat sarcoma
LK	Ligasekomplex
LRP5/6	LDL receptor-related protein 5/6
MDR	multidrug resistance
Min	multiple intestinal neoplasia
MMR	mismatch repair
MRP-2	multidrug resistance associated protein-2
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
4-NPP	4-Nitrophenylphosphat
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline + Tween 20
PFA	p-Formaldehyd
P-gp	Phosphoglykoprotein-170
PIC	Proteinaseinhibitorcocktail

---

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCF/LEF-1	T cell factor/lymphoid enhanced factor-1
TEMED	NNN'N'-Tetramethylethylethylendiamin
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline + Tween 20
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
wnt	wingless + <i>int1</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das colorektale Karzinom – Epidemiologie, Entstehung und Entwicklung

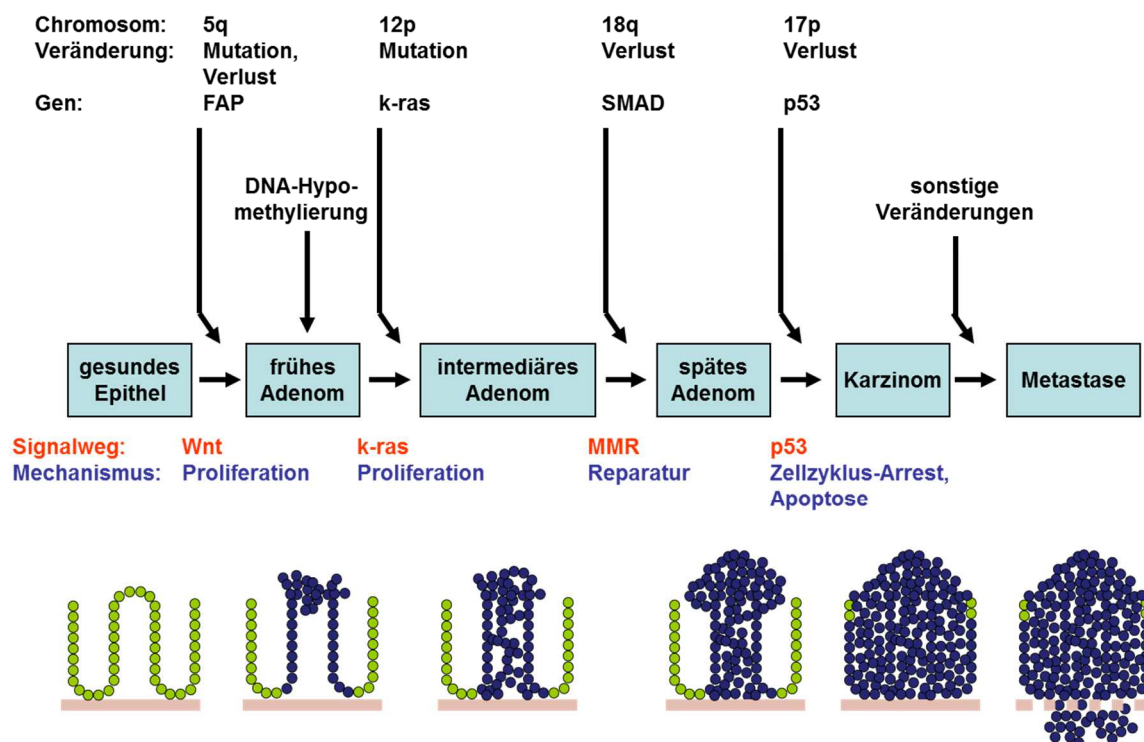
Der Begriff colorektales Karzinom (CRK) umfasst alle Krebserkrankungen des Colons, Rektums und Anus und stellt in westlichen Industrienationen eine der häufigsten Krebserkrankungen dar. In Deutschland ist bei Männern jedes zweite diagnostizierte Krebsleiden nach Prostatakrebs und bei Frauen jedes zweite, nach Brustkrebs, ein CRK [1].

In bis zu 80% der Fälle eines sporadischen CRK ist die Erkrankung auf eine Mutation des adenomatösen *Polyposis coli* (APC)-Gens zurückzuführen [2]. Dieses Tumorsuppressorgen ist auf Chromosom 5q21 lokalisiert [3] und kodiert für ein Protein, welches an das Protein  $\beta$ -Catenin bindet und dessen Abbau im Proteasom veranlasst. Eine Mutation des APC-Gens bewirkt eine  $\beta$ -Catenin Akkumulation im Zytosol und schließlich eine Translokation in den Nukleus, wo  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor wirkt [4]. Unter anderem werden hierdurch Protoonkogene wie c-myc verstärkt exprimiert. C-myc wird für die Expression von etwa 15% aller Gene des menschlichen Erbguts, einschließlich derer, die für die Zellteilung, Zellwachstum und Apoptose zuständig sind, verantwortlich gemacht [5].

Neben einer APC-Mutation kann auch eine Mutation des k-ras (Kirsten-rat sarcoma) oder auch eine Fehlregulierung des TGF- $\beta$  Weges (transforming growth factor- $\beta$ ) [6,7] vorliegen. Durch die Mutation des k-ras verliert die Zelle die Fähigkeit an k-ras gebundenes Guanosintriphosphat zu hydrolysieren und dadurch zu inaktivieren. Die Zelle bleibt hyperaktiv und bedingt durch die andauernden proliferativen Signale wird die Möglichkeit der Krebsentstehung begünstigt [8]. Durch Mitglieder des TGF- $\beta$  Weges werden zytoplasmatische Genregulatorproteine aktiviert, die sogenannten SMADs. Diese SMADs sind zelluläre Signalmoleküle, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung spielen. Sie werden über TGF- $\beta$  Signale phosphoryliert und danach als Transkriptionsfaktoren im Nukleus aktiv [9]. Hier können sie sowohl nach Bindung an  $\beta$ -Catenin, als auch alleine an den TCF/LEF-1 (T cell factor/Lymphoid enhanced



factor) Komplex binden und darüber die Expression von Zielgenen beeinflussen [10]. Die frühesten morphologischen Veränderungen im Rahmen der colorektalen Karzinogenese stellen aberrante Krypten dar. Hierbei handelt es sich um Dysplasien, die aus intakten Epithelzellen hervorgehen und sich zu Adenomen entwickeln [11]. Aus diesen gutartigen Adenomen kann sich im Laufe der Zeit nach weiteren genetischen Veränderungen ein bösartiges Karzinom entwickeln (Abb. 1.1). Diese Vorstellung der Tumorgenese wird als Adenom-Karzinom-Sequenz (AKS) bezeichnet [12, 13].



**Abb. 1.1: Adenom-Karzinom-Sequenz (nach [12,13,14])**

Darstellung der Entwicklung vom normalen Epithel bis zum metastasierenden Karzinom. Durch Mutation bzw. Verlust von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierung von Protoonkogenen entwickelt sich aus gesunden Epithelien ein Karzinom, welches metastasieren kann.

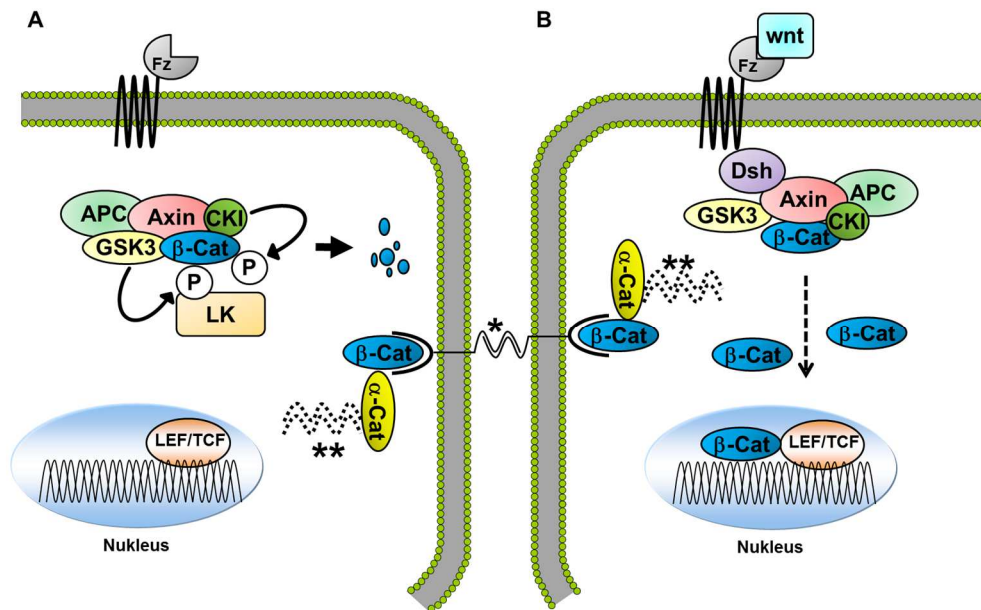
Die Signalwege zum jeweils nächsten Stadium in der AKS sind durch rote und die entsprechenden Mechanismen durch blaue Schrift gekennzeichnet (MMR – mismatch repair, FAP – familiäre adenomatöse Polyposis coli, wnt – wingless + int1)

Die Entstehung eines Karzinoms ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Größe des Adenoms spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese, denn Adenome mit einer Größe > 1 cm führen fast nie zu einem Karzinom [13]. Die Art der Adenome ist entscheidend für die Vorhersage der Entstehung eines Karzinoms. Adenome werden histologisch in tubuläre, tubuvillöse und in villöse klassifiziert. Während tubuläre Adenome das geringste maligne Risiko bergen, weisen villöse

das höchste auf [15]. Weiterhin gibt der Grad der Dysplasie Auskunft darüber, ob das Adenom dazu neigt sich zum Karzinom weiter zu entwickeln [14].

## 1.2 $\beta$ -Catenin – ein zentraler Baustein der Zelladhäsion und des wnt-Signalweges

$\beta$ -Catenin übernimmt einerseits eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von Zell-Zellkontakten und andererseits besitzt es eine regulatorische Funktion im wnt-Signalweg (Abb. 1.2). Zusammen mit  $\alpha$ -Catenin und E-Cadherin bildet  $\beta$ -Catenin einen Proteinkomplex, das Desmosom, zur Ausbildung von Zell-Zellkontakten. E-Cadherin durchspannt die Zellmembran und ist intrazellulär an  $\beta$ -Catenin gebunden, welches über  $\alpha$ -Catenin eine stabile Verknüpfung mit dem Aktinskelett der Zelle herstellt. Über diesen membrangebundenen Proteinkomplex werden nun mittels homophiler Wechselwirkungen mit weiteren Zellen Kontakte ausgebildet. Im wnt-Signalweg nimmt  $\beta$ -Catenin eine zentrale Position im dort gebildeten Destruktionskomplex ein. Liegt kein wnt-Signal vor, dient dieser Komplex dem Abbau überschüssigen  $\beta$ -Catenins. Hier ist  $\beta$ -Catenin, gebunden an ein Axingerüst, von den beiden Kinasen Glykogensynthasekinase (GSK)-3 $\beta$  und Caseinkinase (CK)-I $\alpha$  umgeben. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieses Komplexes ist das Tumorsuppressorprotein APC. Durch mehrere N-terminale Phosphorylierungen steigt die Affinität von  $\beta$ -Catenin gegenüber APC stark an und verdrängt Axin aus dem Destruktionskomplex. Durch die Bindung eines Ligase-Komplexes an das phosphorylierte  $\beta$ -Catenin Ende wird seine Polyubiquitinierung und damit seine Degradation im Proteasom ermöglicht [16].



**Abb. 1.2: Positionen von β-Catenin im wnt-Signalweg (nach [16])**

A: Darstellung des β-Catenin Abbaus ohne das Vorhandensein eines wnt-Signals. Hierbei wird β-Catenin dem proteasomalen Abbau zugeführt B: Nach Aktivierung des wnt-Signalweges transloziert β-Catenin in den Nukleus und vermittelt eine gesteigerte Expression seiner Zielgene. α-Cat – α-Catenin; APC – Adenomatöse *Polyposis coli*; β-Cat – β-Catenin; CKI-α – Caseinkinase-Iα; Dsh – dishevelled; Fz – Frizzled; GSK3 – Glykogensynthasekinase-3β; LK – Ligasekomplex; TCF/LEF – T cell factor/ lymphoid enhanced factor; wnt – „wingless + int1“; \* – E-Cadherin; \*\* – Aktinoskelett

Durch die Bindung von wnt-Signalproteinen an extrazelluläre Rezeptoren kann der wnt-Signalweg ausgelöst werden, wodurch der Destruktionskomplex in der Zelle gehemmt wird. Entweder wird das Protein Dishevelled durch die CK-Iε phosphoryliert, wodurch dieses an einen GSK-3β-binding protein-Komplex bindet und in einen Destruktionskomplex integriert. Hierdurch wird die GSK-3β gehemmt und β-Catenin kann nicht über seinen Destruktionskomplex abgebaut werden. Der β-Catenin-Abbau kann auch über eine Phosphorylierung des LDL-receptor related-protein durch die membranständige CK-Iγ und die GSK-3β blockiert werden. Hierdurch wird Axin aus dem Destruktionskomplex gedrängt und bindet an das phosphorylierte Protein. β-Catenin wird stabilisiert und somit der β-Catenin Abbau verhindert. Des Weiteren entsteht ein Kontakt zur Kernhülle, wodurch es in den Kern transloziert [16,17]. Im Kern kann β-Catenin nun an den Transkriptionsfaktor TCF binden und so als transkriptioneller Aktivator fungieren, indem es dessen Bindung an die transkriptionellen Repressorproteine aus der groucho-Gruppe verhindert [18]. Zu den Zielgenen der TCF/β-Catenin modulierten Transkription gehören beispielsweise die Cyclooxygenase (COX)-2, c-myc oder auch P-gp [19,20]. Die

COX-2 ist in der Lage die Apoptose, u.a. durch eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2, zu hemmen [21,22], während die Apoposerate durch P-gp über einen vermehrten Efflux zytotoxischer Stoffe gehemmt werden kann [23].

$\beta$ -Catenin, welches intrazellulär vorliegt, befindet sich mit dem für den wnt-Signalweg relevanten, intrazellulären  $\beta$ -Catenin im Gleichgewicht, d.h. sollte  $\beta$ -Catenin einerseits vermehrt in den Kern transportiert werden, wird es andererseits vermehrt die Zell-Zellkontakte verlassen [24]. Dies hat zur Folge, dass Krebszellen leichter migrieren und proliferieren können, da die Zelladhäsion gemindert wird [25].

Der wnt-Signalweg offenbart seine physiologische Relevanz speziell in somatischen und embryonalen Stammzellen. Sobald spezifische Zielgene aktiviert werden, sind die Stammzellen in der Lage Vorläuferzellen zu bilden. In den Krypten des Intestinus werden auf diese Weise rasch proliferierende und differenzierende Zellen gebildet, die lumenwärts migrieren. Hier scheint der wnt-Signalweg entscheidend für die Krypten-Villi Homöostase zu sein. Durch diese Migration vom Boden der Krypten zur Spitze der Villi lässt die Proliferationsrate nach. Außerdem entwickeln diese Zellen die Möglichkeit das zelluläre Selbstmordprogramm, die Apoptose, einzuleiten [26,27]. Tritt nun eine Mutation somatischer Zellen auf, gelingt es immer einigen Zellen der eingeleiteten Apoptose zu entrinnen, wodurch letztlich die Promotion des Tumors gefördert wird [24,25].

## **1.3 Apoptose und colorektale Karzinogenese**

Unter physiologischen Bedingungen herrscht im Gewebe ein Gleichgewicht zwischen Untergang und Neubildung von Zellen. Die Balance zwischen Apoptose und Proliferation der Enterozyten entscheidet demnach über die Aufrechterhaltung des Gewebes und der Morphologie der Mukosa.

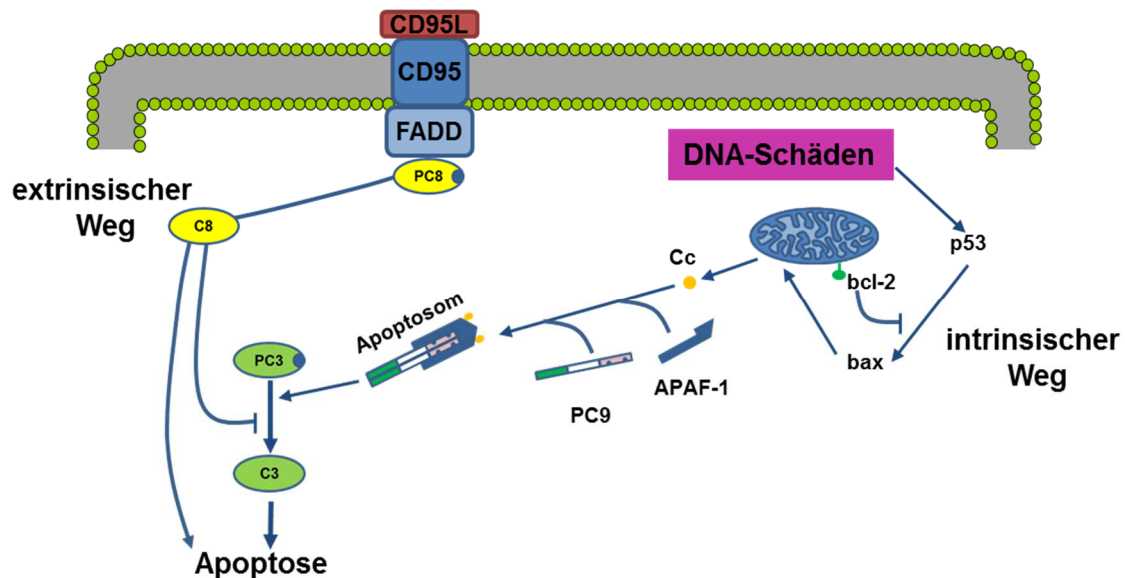
### **1.3.1 Regulation der Apoptose**

Die Zellzahl von vielzelligen Organismen wird sowohl durch Zellteilung, wie auch durch den Zelltod reguliert. In Zellen, die nicht mehr benötigt werden, oder in defekten Zellen wird ein Selbstmordprogramm gestartet, welches diese zugrunde

gehen lässt. Dieser Vorgang wird als Apoptose bezeichnet. Der Begriff entstammt dem Griechischen und setzt sich aus den Wortteilen  $\alpha\pi\omicron$  („weg“) und  $\pi\tau\omega\sigma\iota\varsigma$  („fallen“) zusammen und ist in Anlehnung an das Fallen von Laub gewählt [28]. Einerseits spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie z.B. der Morphogenese von Organen und Geweben des wachsenden Embryos [29], andererseits werden Störungen der Apoptose mit degenerativen Erkrankungen wie Krebs in Verbindung gebracht [28]. Die eingeleitete Apoptose bewirkt morphologische Veränderungen der Zelle. Diese schrumpft zuerst und verliert dann den Kontakt zum umgebenden Gewebe. Anschließend findet eine Kondensation des Chromatins, sowie eine Spaltung der DNA statt. Zuletzt kommt es zum Membran-Blebbing, hierbei zerfällt die Zellmembran durch die Bildung kleiner Vesikel, den apoptotic bodies, welche schließlich phagozytiert werden [28]. Die Apoptose lässt sich grundsätzlich in zwei Phasen unterteilen, in die Initiationsphase und in die Exekutionsphase.

Die Initiationsphase beschreibt den Weg bis zur Auslösung der Caspase-Kaskade und die Exekutionsphase den weiteren Verlauf des Selbstmordprogramms. Hierbei wird der extrinsische vom intrinsischen Signalweg unterschieden (Abb. 1.3) [29,30]. Der extrinsische Signalweg ist rezeptorvermittelt. Er wird initiiert durch die Bindung bestimmter Liganden an ihre Todesrezeptoren wie z.B. Bindung des Tumor Nekrose Faktors (TNF)  $\alpha$  an den TNF-Rezeptor, oder des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor. Diese Ligandenbindung bewirkt eine Oligomerisierung der Rezeptoren und führt schließlich zur Bildung eines Apoptose induzierenden Signalkomplexes, den death inducing signaling complex (DISC). Über DISC werden Initiatorcaspasen gebunden und aktiviert [30,31]. Der intrinsische Signalweg ist der mitochondrienabhängige Signalweg. Hierbei kommt es durch die Freisetzung von Cytochrom c aus der inneren Mitochondrienmembran in das Zytosol zur Bildung des Apoptosoms, einem Komplex aus Cytochrom c, der Pro-Caspase-9 und APAF-1, dem apoptotischen Protease Aktivierungs Faktor-1. Dieser ermöglicht die Spaltung und dadurch die Aktivierung der Pro-Caspase-9 innerhalb des Apoptosoms, wodurch schließlich die Caspase-Kaskade eingeleitet wird. Die Freisetzung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran wird durch das Protein bax, einem Mitglied der bcl-2 Proteinfamilie, vermittelt. Nach der Schädigung der DNA bewirkt es als Co-Faktor von p53, dem „Wächter des Genoms“, eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Das Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen bcl-2

Proteinen entscheidet über die Initiation des intrinsischen Apoptoseweges [32]. Beide Signalwege münden letztlich in einen einheitlichen Signalweg, der die Aktivierung einer Kaskade von Effektorcaspasen initiiert. Hierbei handelt es sich um Proteasen, welche intrazellulär inaktiv als Pro-Enzym vorliegen und spezifisch an Cys-Asp-Bindungen spalten. Caspasen spalten sowohl regulatorische wie auch strukturelle Moleküle und ihre Aktivierung gipfelt schließlich im Tod der Zelle [33].



**Abb. 1.3: Apoptose – extrinsischer und intrinsischer Signalweg (nach [33])**

Durch Bindung von Liganden an die membranären Todesrezeptoren werden Apoptose induzierende Caspasen aktiviert (extrinsischer Weg). Proapoptotische Proteine wie bax verursachen nach DNA-Schädigung eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Hierdurch werden nach Bildung des Apoptosoms ebenfalls Apoptose induzierende Caspasen aktiviert (intrinsischer Weg).

APAF-1 – apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1; Cc – Cytochrom c; C3 – Caspase-3; C8 – Caspase-8; CD95 – Fas-Rezeptor; CD95L – Fas-Ligand; FADD – Fas assoziierte Todesdomäne; PC3 – Procaspase-3, PC8 – Procaspase-8; PC9 – Procaspase-9

Die Exekutionsphase der Apoptose beschreibt den Ablauf der Caspase-Kaskade. Hierbei werden die Caspasen-2, -8, -9 und -10 als Initiatorcaspasen von der Caspase-3 und zu einem geringeren Teil den Caspasen-6 und -7 als Effektorcaspasen unterschieden [34]. Die Caspase-8 wird als Schlüssel-Initiator der TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptose beschrieben [35]. Nach der Aktivierung dieser Todesrezeptoren wird die Caspase-8 via Kopplung an FADD (Fas associated death domain) in DISC rekrutiert. Hierdurch wird die Caspase-8 aktiviert und der programmierte Zelltod initiiert [35,36,37]. Die Bedeutung der Caspasen-2 und -10 für die Apoptose ist bis heute nicht endgültig geklärt. Caspase-10 besitzt eine

ähnliche Struktur wie die Caspase-8, beide besitzen zwei DEDs (death effector domain), weswegen funktionelle Überschneidungen im Bereich der Fas-Liganden vermittelten Apoptose diskutiert werden [35,38,39]. Milhas *et al.* (2005) zeigten, dass die Caspase-10 *in vitro* das Protein bid, ein Mitglied der bcl-2 Familie, spalten und dadurch den Mitochondrien abhängigen Apoptoseweg einleiten kann [39]. Die Caspase-2 ist als eine der ersten apoptotischen Caspasen identifiziert und beschrieben. Sie ist im Zellkern, dem Golgi-Komplex und dem Zytosol lokalisiert. Sie wird sowohl mit dem extrinsischen wie auch mit dem intrinsischen Weg in Verbindung gebracht und wird wesentlich im Zusammenhang mit DNA-Schäden und zytotoxischem Stress der Zelle gesehen. Die Aktivierung der Caspase-2 erfolgt ebenfalls nach Aktivierung eines membranständigen Rezeptors [40].

### 1.3.2 Fehlregulation der Apoptose bei colorektalen Karzinomen

Betrachtet man Darmkrebs als genetische Erkrankung, welche durch Veränderungen an Schnittstellen des Zellstoffwechsels verursacht wird, dann stellt sich die Genese eines Tumors als Herausbildung eines Gewebes aus genetisch gleichen Zellen dar, die nicht sensitiv auf apoptotische Signale reagieren. Diese klonierten Zellen zeichnen sich gegenüber „herkömmlichen“, also gesunden Zellen z.B. durch eine erhöhte Lebensspanne oder der Fähigkeit genetische Veränderungen zu akkumulieren, aus [41]. Durch diese genetischen Veränderungen von Protoonkogenen oder von Tumorsuppressorgenen wie APC kann das Gleichgewicht von Zellaufbau und Zellabbau gestört werden [42–45].

Eine mögliche Folge einer Mutation des APC-Gens wäre eine erhöhte Expression der COX-2, welche in etwa 80% der CRK auftritt und das Wachstum eines Tumors begünstigen kann [46]. Weiterhin wird durch die COX-2 die Produktion des antiapoptotischen bcl-2 gesteigert, wodurch sich das Gleichgewicht zu Ungunsten der Apoptose hin zu einer Neoplasie verschieben könnte [47]. Folglich ist eine Inaktivierung der antiapoptotischen Mitglieder der bcl-2 Familie ein Ziel, das durch viele Chemotherapeutika angestrebt wird. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der proapoptotischen bcl-2 Proteine wie bax und bid. Diese Proteine translozieren an die äußere Mitochondrienmembran und oligomerisieren dort. Hier wird vermutet, dass durch diese Oligomerisierung eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran entsteht, wodurch schließlich Cytochrom c freigesetzt wird,

welches seinerseits zu einer Aktivierung des Apoptosoms führt [48]. Die insgesamt bedeutendste Ursache einer fehlregulierten Apoptose findet sich bei Darmkrebs, wie auch bei anderen Krebsarten, in Form eines mutierten p53 Tumorsuppressors. Diese Mutation findet sich in mehr als der Hälfte aller humanen Tumore. Hierdurch wird schließlich eine Aktivierung der Proteine unmöglich, die für die Apoptose obligat und im p53 Signalweg nachgeschaltet sind, wie z.B. bax und bid. Neben der Apoptose reguliert p53 noch Zellwachstum, Zellzyklus oder fungiert nach seiner Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktor für Proteine wie p21. p21 ist ein Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen und vermittelt die Effekte des p53 im Hinblick auf eine Hemmung des Zellzyklus [49,50].

## **1.4 Die multidrug resistance-Problematik in der Tumorthherapie**

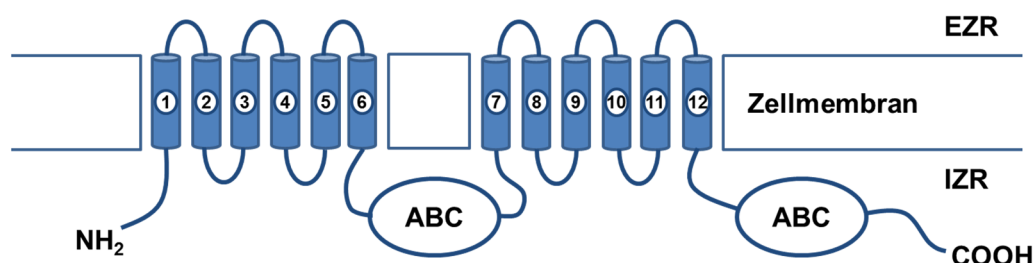
Im klassischen Sinne umschreibt der Begriff multidrug resistance (MDR) die Resistenz von Tumorzellen gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher Medikamente. Vielfach wird dies durch eine vermehrte Expression ATP-abhängiger Effluxpumpen, den ABC (ATP binding cassette)-Transportern bedingt [51]. Die Fähigkeit der ABC-Transporter zellfremde Stoffe aus der Zelle zu entfernen, bevor diese die Zellen schädigen können, bedeutet unter physiologischen Bedingungen einen Vorteil. Im Krankheitsfall, wie z.B. bei Krebs, ist diese Eigenschaft nicht erwünscht, da die Zytostatika gezielt in der kranken Zelle platziert werden sollen, um dort ihre Wirkung zu entfalten [52]. Die Aussicht auf eine erfolgreiche Therapie wird durch die erhöhte Expression der epithelialen Transportermoleküle deutlich geschmälert [53]. Die größte Bedeutung bei der Vermittlung einer MDR besitzt das Phosphoglykoprotein-170 (P-gp). Wird P-gp bereits unter physiologischen Bedingungen exprimiert, können Tumore in diesen Geweben durch den Stress der Therapie unempfindlich gegenüber den eingesetzten Therapeutika reagieren. Dieses Phänomen wird als intrinsische Resistenz bezeichnet. Demgegenüber steht die erworbene Resistenz, bei welcher sich vorübergehend gute medikamentöse Erfolge erzielen lassen, die Tumore aber im Laufe der Therapie eine Behandlungsresistenz entwickeln [23,52,53]. Neben dem transporterbasierten MDR-Phänomen kann die Unempfindlichkeit des Tumors durch seine Größe über einen nicht-zellulären Resistenzmechanismus vermittelt werden. Hierbei nimmt der



Tumor durch seine Größe nicht mehr an der Versorgung über das Gefäßsystem teil und erwirbt durch die mangelnde Versorgung, sowohl mit Nährstoffen, wie auch mit Chemotherapeutika, eine Medikamentenresistenz. Auf intrazellulärer Ebene kann der Resistenzmechanismus zum einen über die veränderte Aktivität protektiver Enzyme wie der Topoisomerase oder Glutathion-S-Transferase vermittelt werden. Während eine Verschiebung des Gleichgewichts pro- und antiapoptotischer Proteine ebenso die Entstehung einer MDR begünstigen kann [53].

### 1.4.1 Phosphoglykoprotein-170 (P-gp)

Juliano und Ling haben 1976 erstmals den Nachweis für das Phosphoglykoprotein-170 erbracht und das MDR-Phänomen beschrieben [54]. P-gp, das Produkt des humanen *MDR1*-Gens, ist ein etwa 170 kDa großes, membrandurchspannendes und ATP-hydrolysierendes Protein. In gesundem Gewebe ist es in Leber, Niere, Pankreas, Intestinum und Blut-Hirn-Schranke exprimiert. Im Enterozyten ist es in der Membran des Bürstensaums lokalisiert [55,56], im Hepatozyten in der kanalikulären und im Nierenepithel in der tubulären Membran. Dieses apikale Lokalisationsmuster deutet auf die Rolle dieses ABC-Transporters in der Entsorgung zytotoxischer Metabolite, Xenobiotika oder Medikamente hin [55,57]. Viele Krebszellen zeigen eine erhöhte P-gp Expression und damit verbunden eine Resistenz gegenüber den verschiedensten Chemotherapeutika [58]. MDR1 wird auch als ABCB1 bezeichnet. ABCB1 gehört demnach in die ABCB-Subfamilie [59] und besteht aus 1280 Aminosäuren. P-gp bildet zwei homologe Hälften mit insgesamt zwei Transmembran (TMD)- sowie zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) aus (Abb. 1.4) [58,60].

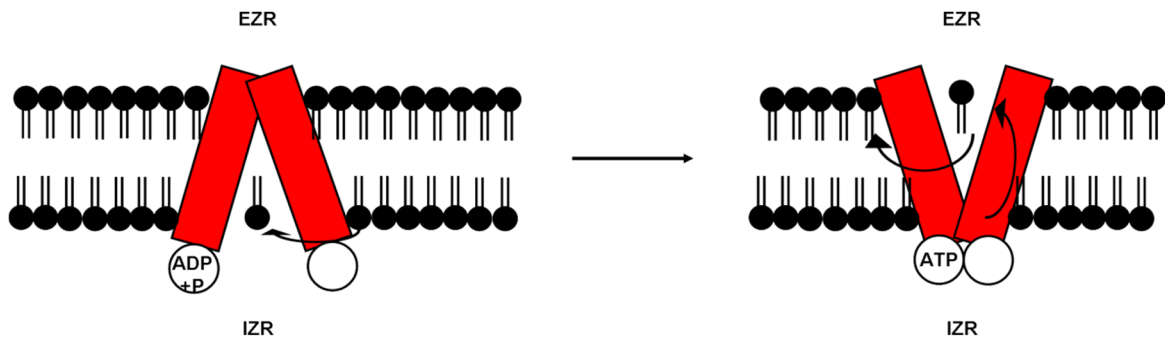


**Abb. 1.4: Membrantopologie von P-gp (nach [60])**

ABC - ATP binding cassette (=NBD); EZR - extrazellulärer Raum; IZR - intrazellulärer Raum

Auf je sechs der hydrophoben membrandurchspannenden Helices folgt zytoplasmatisch eine hydrophile NBD. Die NBDs setzen sich aus den Walker A- und Walker B-Motiven, sowie einer ABC-Signatur, die für alle ABC-Transporter spezifisch ist, zusammen [60]. Die beiden Hälften sind über eine flexible Linkerregion miteinander verbunden. Diese Linkerregion ist höchstwahrscheinlich für die Kommunikation bzw. Interaktion zwischen den NBDs verantwortlich. Ohne diese Linkerregion ist eine uneingeschränkte Funktion des P-gp nicht gewährleistet [61]. Während die NBDs ATP binden und hydrolysieren, enthalten die TMDs Bindungsstellen für Substrate wie z.B. das Tumorthérapeutikum Topotecan oder die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin-123 (R-site) und Hoechst-33342 (H-site) [62]. Die ATP-Bindung bewirkt eine Konformationsänderung, die in einer veränderten Exposition der Substratbindungsstelle gegenüber der Membran resultiert. Es kommt zur Bildung einer Pore, welche die Translokation über die Zellmembran ermöglicht [63]. Die Substratbindung bewirkt eine Hydrolyse des ATP und damit verbunden eine Substratverschiebung vom Intrazellulärraum (IZR) in den Extrazellulärraum (EZR) [64]. Allerdings werden auch alternative Wirkmechanismen von P-gp diskutiert [65,66,67].

Neben seinen resistenzvermittelnden Eigenschaften besitzt P-gp in gesunden Geweben verschiedene Aufgaben. So wird P-gp beispielsweise als Translokator von Lipiden beschrieben [68,69]. Hierbei kann es als Flippase fungieren. Wenn das Lipid zytosolisch bindet, wird es nach der ATP-Hydrolyse extrazellulär freigesetzt. Nach dieser „flop“-Bewegung, bei der es seine Orientierung umkehrt, liegt es frei im EZR vor. Andererseits kann das Lipid auch gegen ein anderes ausgetauscht werden, welches dann zurück „flippt“ (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Transport von Lipiden durch ABC-Transporter über die Zellmembran (Flip-Flop-Mechanismus; nach [52])**

Der ABC-Transporter ist rot dargestellt, während die Lipide der Zellmembran schwarz abgebildet sind. Die Pfeile kennzeichnen die Translokation der Lipide.

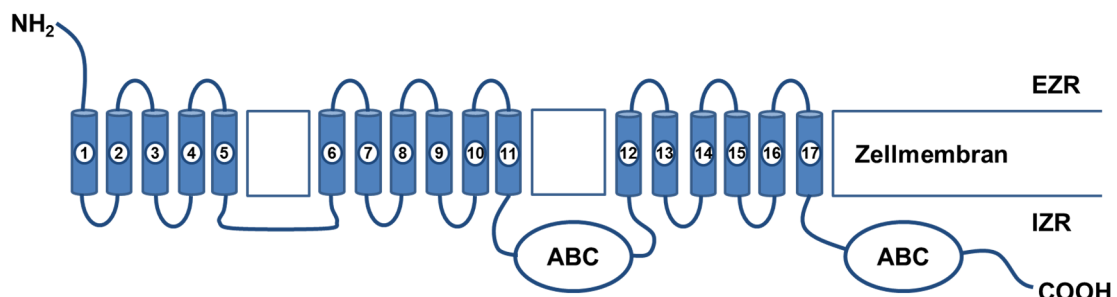
Neben der Eigenschaft als Lipid-Translokator zu wirken [52,68], wird P-gp mit der Translokation von Glukosylceramid in Verbindung gebracht, wodurch die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase ansteigt [70,71]. Ein Hinweis, dass P-gp mit der Aktivität der Glukosylceramid-Synthase verknüpft ist, ist dass verschiedene P-gp Inhibitoren die Glukosylceramid-Synthase hemmen [72] und dass Glukosylceramid-Synthaseinhibitoren selektiv in P-gp exprimierenden Karzinomzellen Apoptose auslösen [73]. Tab. 1.1 fasst die wesentlichen Charakteristika der in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transporter zusammen.

Tab. 1.1: Überblick über die untersuchten ABC-Transporter

	Gen, Lokalisation	Struktur	Vorkommen		Substrate	Inhibitoren
			allgemein	im Intestinum		
<b>P-gp</b>	<i>MDR1</i> ( <i>ABCB1</i> ), 7q21	1280 AS 170 kDa 2 NBD, 12 TMD	Leber, Niere, Testis, Placenta, Gehirn, Intestinum, Lunge	Bürstensaummembran des gesamten Intestinums (Abnahme von distal nach proximal)	Rhodamin 123, Cyclosporin A, Etoposid, Ivermectin, Benzpyren, Topotecan, Camptothecin	Colchicin, Verapamil, Vinblastin, versch. Flavonoide
<b>MRP-2</b>	<i>MRP-2</i> ( <i>ABCC2</i> ) 10q24	1545 AS 190 kDa 2 NBD, 17 TMD	Leber, Niere, Testis, Placenta, Gehirn, Intestinum	Bürstensaummembran des proximalen Intestinums (Abnahme von proximal nach distal)	Arsen, Cisplatin, Irinotecan, Ochratoxin A, Topotecan	GF120918, Glutathion, MK-571, versch. Flavonoide
<b>BCRP</b>	<i>BCRP</i> ( <i>ABCG2</i> ) 4q22	655 AS 72 kDa 1 NBD, 6 TMD	Ovarien, Placenta, Testis, Niere, Leber, Gehirn, Intestinum	Bürstensaummembran des gesamten Intestinums	17- $\beta$ -Östradiol, Hoechst 33342, Topotecan	GF120918, SN-38, Fumitremorgin C, versch. Flavonoide

### 1.4.2 Multidrug-resistance-associated protein-2 (MRP-2)

Cole *et al.* beschrieben 1992 erstmalig das MDR associated protein (MRP) [74]. Der 190 kDa große ABC-Transporter MRP-2 ist das Produkt des *ABCC2* Gens [75]. MRP-2 weist eine ähnliche Topographie wie P-gp auf. Es besteht ebenfalls aus zwei homologen Hälften mit je sechs membrandurchspannenden Helices, denen eine zytosolische NBD nachgeschaltet ist. Zusätzlich besitzt MRP-2 fünf TMDs mit einem extrazellulären NH<sub>2</sub>-Terminus vor diesen beiden Hälften (Abb. 1.6) [60]. Die transportierten Substrate werden vorwiegend als Glutathion- oder Glukuronsäurekonjugate exportiert und teilweise durch die Konjugation schon entgiftet [76,77].



**Abb. 1.6: Membrantopologie von MRP-2 (nach [60])**

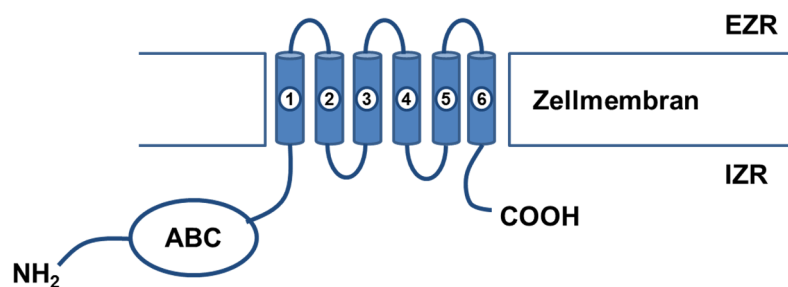
ABC - ATP binding cassette (=NBD); EZR – extrazellulärer Raum; IZR – intrazellulärer Raum

Das aus 1545 Aminosäuren bestehende Protein ist vorwiegend in der apikalen Hepatozytenmembran lokalisiert, weitere Nachweise sind in Niere und Intestinum, ebenfalls apikal, erfolgt [78]. Unter physiologischen Bedingungen transportiert dieser Transporter das beim Hämoglobinabbau entstandene Bilirubinidglucuronid in die Gallenkanalikuli [76]. Tumortheraeutika werden dem Anschein nach von MRP-2 nicht wie durch P-gp direkt, sondern in Form anionischer Konjugate bzw. im Cotransport mit Glutathion transportiert [79].

### 1.4.3 Breast cancer resistance protein (BCRP)

Neben den "normalen" ABC-Transportern sind noch die „Halbtransporter“ beschrieben. Diese Transporter besitzen nicht die obligatorischen zwei, sondern jeweils nur eine TMD und eine NBD (Abb. 1.7). Einen solchen Halbtransporter stellt

das 1998 beschriebene BCRP dar, welches aus 655 Aminosäuren besteht und etwa 72 kDa groß ist [80,81].



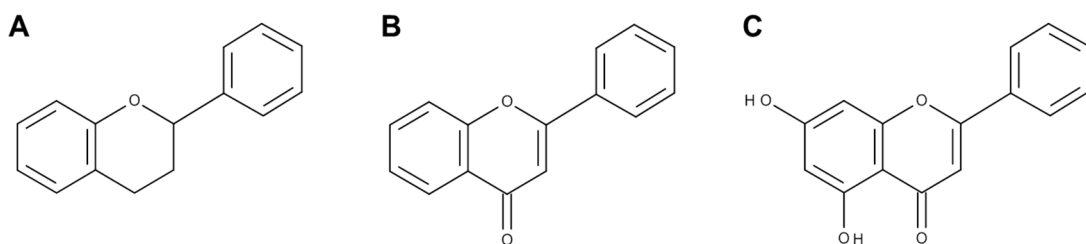
**Abb. 1.7: Membrantopologie von BCRP (nach [60])**

ABC - ATP binding cassette (=NBD); EZR – extrazellulärer Raum; IZR – intrazellulärer Raum

Im gesunden Gewebe ist BCRP unter anderem in Plazenta, Leber, Blut-Hirn-Schranke, Niere und Intestinum lokalisiert [82]. Für den Transportvorgang werden von diesen ABC-Transportern Homo- und Oligomere ausgebildet. Ähnlich wie P-gp und MRP-2 eliminiert auch BCRP eine Vielfalt unterschiedlicher Stoffe aus der Zelle. So werden sulfatierte Hormonmetabolite, Fluoreszenzfarbstoffe wie Hoechst-33342, Flavonoide und auch Antibiotika aus der Zelle entfernt [82,83]. BCRP ist in der Lage eine Resistenz gegenüber Topotecan zu vermitteln [84]. Auch Irinotecan, ebenso ein Camptothecin-Derivat wie Topotecan, und sein aktiver Metabolit SN38 stellen typische BCRP-Substrate dar und werden durch Glukuronidierung mittels UDP-Glukuronyltransferase entgiftet [85]. BCRP transportiert außerdem weitere Glukuronsäurekonjugate, so z.B. das 17- $\beta$ -Östradiolglucuronid, wie auch sulfatierte Konjugate von Östron oder Dehydroepiandrosteron. Folglich scheint BCRP Xenobiotika und endogene Metabolite, ebenso wie MRP-2, in ihrer sulfatierten oder glukuronidierten Form zu transportieren [86,87,88]. Für verschiedene Flavonoide, wie z.B. Chrysin ist nachgewiesen, dass sie potent BCRP inhibieren und somit die Zytotoxizität von Irinotecan und Topotecan vervielfachen können [89,90]. Katayama *et al.* (2007) sehen hier vielversprechende Ansätze, eine BCRP vermittelte MDR zu umgehen und chemotherapeutische Ansätze zu optimieren [90]. BCRP wird nach der aktuellen Nomenklatur in die ABCG Gruppe einsortiert und als ABCG2 bezeichnet [91].

## 1.5 Flavonoide – Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in der Krebstherapie

Die Flavonoide stellen eine Gruppe polyphenolischer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe dar. Dieser Gruppe gehören bis dato über 9000 identifizierte Substanzen an und sie kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor. Flavonoide können in Abhängigkeit ihrer Substituenten in verschiedene Untergruppen unterteilt werden: Flavone, Flavanone, Isoflavone, Flavanole, Anthocyanidine und Flavonole. Allen Flavonoiden gemein ist die grundlegende 1,3-Diphenylpropan-1-on-Struktur, welche aus einem p-Cumaroyl-CoA, sowie aus drei Malonyl-CoA-Molekülen synthetisiert wird. Bei der Synthese entsteht als Zwischenprodukt ein Chalkon, aus welchem die Flavanone gebildet werden. Die Flavanone sind ihrerseits Ausgangspunkt für alle weiteren Flavonoide [92]. Abb. 1.8 zeigt die Grundstruktur aller Flavonoide, sowie die Strukturformeln von Flavon und Chrysin. In der Pflanze zeigen Flavonoide ein weites Funktionsspektrum, welches von Schutz vor UV-Strahlung, über Blütenfärbung bis hin zu Abwehrmechanismen reicht [93].



**Abb. 1.8: Strukturformeln der Flavonoide**

Darstellung der Strukturformeln von Flavan (Grundstruktur aller Flavonoide) (A), Flavon (B) und Chrysin (C).

Neben diesen Eigenschaften zeigen Flavonoide ein gesundheitsförderndes Potential, indem sie antioxidativ, antiproliferativ oder antikanzerogen wirken [92]. Bereits Ende der 1990er Jahre wurden sowohl Effekte auf die Proliferation, wie auch auf den Zellzyklus, die Differenzierung und die Apoptose beschrieben [94,95]. Diese protektiven Eigenschaften der Flavonoide werden mit ihrem breiten Spektrum biochemischer und pharmakologischer Eigenschaften in Verbindung gebracht [96]. In verschiedenen Studien ist es gelungen nachzuweisen, dass die Flavonidaufnahme negativ mit der Häufigkeit der Krebserkrankungen korreliert [97,98]. Die große strukturelle Vielfalt und das gemeinsame Vorkommen der unterschiedlichsten Flavonoide erschweren es die einzelnen Substanzen gezielt in

kausale Zusammenhänge zu bringen [99]. Einzelne Flavonoide gehören zu den sogenannten reversing agents. Hierbei handelt es sich um Substanzen, welche eine MDR umkehren können, d.h. die Karzinomzellen werden gegenüber den Chemotherapeutika wieder sensibilisiert. Bereits frühzeitig hat man entdeckt, dass eine Blockierung des transmembranären Transportes der Chemotherapeutika durch Modulatoren der ABC-Transporter einer MDR vorbeugen kann. In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Substanzen entdeckt, die die Aktivität von P-gp und verwandten Transportern inhibieren oder zumindest einschränken. Allerdings zeigen sich diese im Gegensatz zu ihren vielversprechenden *in vitro* Ergebnissen *in vivo* eher enttäuschend, da sie häufig von einer Vielzahl Nebenwirkungen begleitet werden. In der Krebstherapie verspricht man sich von den Flavonoiden die Möglichkeit in den Karzinomzellen gezielt Apoptose auszulösen. Obwohl Flavonoide Antioxidantien sind, induzieren manche Vertreter dieser Stoffgruppe die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Karzinomzellen und nach Aktivierung der Caspase-Kaskade Apoptose [95,99,100,101].

#### *Flavonoide – als Induktoren der Apoptose in colorektalen Karzinomzellen*

In HT-29 und HCT-116 Colonkarzinomzellen konnte durch Flavon potent Apoptose induziert werden [96,102,103], indem es den intrinsischen Apoptoseweg aktiviert [96]. Bis heute sind für mehrere Flavonoide unterschiedliche Mechanismen der Apoptose-Induktion nachgewiesen. Zu diesen nachgewiesenen Wirkmechanismen zählt die dosisabhängige Generierung reaktiver Sauerstoffspezies ebenso wie deren Akkumulation in verschiedenen Karzinomzelllinien [95,103,109], oder die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in Leukämiezellen, wodurch letztlich die Caspasen-3 und -9 aktiviert wurden [95]. Die Apoptose-Induktion ist auch in anderen Zelllinien gelungen. So konnten Wang *et al.* (1999) durch Flavonoide effektiv Apoptose in HL-60 Leukämiezellen auslösen. Hier zeigte sich das Flavonoid Apigenin als potenter Aktivator der Effektorcaspase-3, wodurch die Aktivität der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) gehemmt wird [95]. Dieses Enzym wird durch die Caspasen-3 und -7 gespalten und verliert durch die Spaltung die Fähigkeit die DNA zu reparieren [95,104,105]. Durch die PARP-Spaltung müssen die Krebszellen die Möglichkeit der homologen Rekombination zur Reparatur der DNA nutzen. Diese Möglichkeit ist allerdings bei vielen Karzinomzellen defekt, so dass sich hier ein vielversprechender Therapieansatz darbietet [106]. Neben der Caspase-3 bewirkte Apigenin bei Wang *et al.* (1999)



noch eine Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, sowie eine Prozessierung der Pro-Caspase-9 hin zur Caspase-9 [95]. Die Aktivierung der Caspase-3 durch das Flavonoid Flavon lässt sich auch in der Colonkarzinom Zelllinie HT-29 nachweisen. Neben der Caspase-Aktivierung [107] wird die Expression der antiapoptotischen Proteine bcl-2 oder bcl-X<sub>L</sub> reduziert und proapoptotische Proteine wie bid oder bax werden vermehrt exprimiert [108,109]. Die Beeinflussung dieses Verhältnisses von proapoptotischen zu antiapoptotischen bcl-2 Proteinen stellt eine mögliche Modifikation der Apoptose durch Flavonoide dar [110].

#### *Flavonoide – als Modulatoren einer ABC-Transporter bedingten MDR*

Transportproteine spielen für Karzinomzellen eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme, wie auch bei der Exklusion zytotoxischer Stoffe. Hinsichtlich der Exklusion kann die Überexpression von P-gp als einer der wesentlichen Mechanismen zur Entwicklung einer MDR betrachtet werden. Hierdurch kann in diesen Zellen der programmierte Zelltod verhindert werden [111]. Schon früh konnten erste P-gp Inhibitoren wie z.B. Verapamil identifiziert werden [112]. Im Laufe der Zeit wurden diese durch andere Wirkstoffe mit geringeren Nebenfolgen ersetzt und manche dieser Substanzen wie z.B. Tariquidar auch auf ihre klinische Wirksamkeit getestet [113]. Da diese aber insgesamt nicht überzeugen konnten, wird heute empfohlen für die Entwicklung neuer Inhibitoren auf natürliche Stoffe zurück zu greifen [29]. Solche natürlichen Stoffe stellen die Flavonoide dar. Flavonoide sind in der Lage *in vitro* wie auch *in vivo* als reversing agents zu fungieren und sie zeichnen sich durch eine breite Verfügbarkeit, wie auch eine geringe Toxizität aus [114]. Gemäß Ambudkar *et al.* (1999) sollen mögliche reversing agents eine der folgenden vier Eigenschaften aufweisen. Entweder binden die Modulatoren direkt an der Substratbindungsstelle, wodurch die Aktivität des ABC-Transporters gehemmt wird, oder die Bindung von ATP bzw. dessen Hydrolyse wird unterbunden. Weiterhin besteht als vierte Möglichkeit die Entkopplung von ATP Hydrolyse und Substrattranslokation [115]. Die Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften des Lipid-Bilayers, in welchen die ATP-Transporter eingebettet sind, stellt nach Hendrich und Michalak (2003) einen weiteren möglichen Wirkmechanismus für Flavonoide dar [116].

Der Interaktion zwischen ABC-Transporter und Flavonoid liegt vermutlich eine Bindung der Flavonoide an die zytosolischen NBDs zu Grunde. Hierbei binden die Flavonoide an die NBDs und blockieren diese, so dass kein Substrat mehr transportiert werden kann und dadurch die Aktivität des Transporters gehemmt wird [117].

## 2 Zielsetzung

Krebszellen zeichnen sich durch eine geringe Sensitivität gegenüber Signalen aus, die den programmierten Zelltod, die Apoptose auslösen. Ein Mechanismus, der dazu beiträgt, ist die erhöhte Expression von ABC-Transportern. Da zahlreiche Chemotherapeutika, wie z.B. Topotecan, Substrate dieser Transporter darstellen, ist ihre erhöhte Expression Ursache einer in der Therapie häufig zu beobachtenden Vielfachresistenz gegenüber Chemotherapeutika. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss zweier Flavonoide, die Apoptose in CRK-Zellen induzierten, auf folgende mit einer MDR in Verbindung stehenden Parameter *in vitro* und *in vivo* untersucht werden:

- Modulation der ABC-Transporter-Aktivität und -Expression durch Flavon und Chrysin im Caco-2 Zellmodell. Die Transporteraktivität wurde mittels fluoreszierender Substrate bestimmt und die Expression der Transporter mittels Western Blotting erfasst. Des Weiteren wurden die Einflüsse der beiden Flavonoide auf die Apoptose, die durch das Tumorthapeutikum Topotecan ausgelöst wurde, ermittelt. Die Bestimmung der Apoptose erfolgte durch die Messung der Caspase-3-Aktivität, sowie anhand der DNA-Fragmentierung.
- Überprüfung einer möglichen Modifizierung des wnt-Signalweges durch Flavon und Chrysin als Ursache für eine veränderte Apoptose- bzw. Zelldifferenzierungsrate durch Beeinflussung der Lokalisation des Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin in Caco-2 Zellen. Die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin wurde immunhistochemisch bestimmt.
- Beeinflussung von Größe und Anzahl der Adenome im Intestinaltrakt der APC<sup>min/+</sup>-Maus durch Applikation von Flavon. Zum Nachweis apoptotischer Zellen *in vivo* wurde die gespaltene, aktive Form der Caspase-3 in intestinalen Gewebeschnitten der APC<sup>min/+</sup>-Maus immunhistochemisch dargestellt.
- Modulation der ABC-Transporter-Expression durch Flavon im APC<sup>min/+</sup>-Mausmodell. Die Expression wurde durch Western Blot Experimente sowie durch immunhistochemische Detektion ermittelt.

- Bestimmung der  $\beta$ -Catenin-Lokalisation, welches als Transkriptionsfaktor möglicherweise die Promotion colorektaler Karzinome durch eine veränderte zelluläre Verteilung begünstigt. Die Lokalisation wurde immunhistochemisch an Gewebeschnitten des Intestinums der APC<sup>min/+</sup>-Maus nachgewiesen.

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung der Caco-2 Zelllinie

Die Caco-2 Zelle ist eine adhärent wachsende, colorektale Karzinomzelle, welche im Zellverband einen Monolayer bildet. 1974 wurden Caco-2 Zellen aus dem Adenokarzinom eines weißen Mannes gewonnen. Für die Experimente wurden die Passagen 13 bis 45 verwendet. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist in Tab. 3.1 dargestellt

**Tab. 3.1: Zusammensetzung des Caco-2 Kulturmediums**

DMEM	500 ml
FKS	50 ml (10% v/v)
Glutamax	5 ml (1% v/v)
Nichtessentielle Aminosäuren	5 ml (1% v/v)
Penicillin-Streptomycin	0,5 ml (0,1% v/v)

(DMEM - Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium; FKS - fötales Kälberserum)

Die für diese Arbeit verwendeten Caco-2 Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ-Nr.: ACC 169, Braunschweig, D) bezogen. Die Zellen wurden bei 37 °C und einem Kohlendioxidgehalt von 5% kultiviert (Galaxy Brutschrank, RS-biotech, Wiesbaden, D). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Heraeus instruments, Berlin, D) durchgeführt. Montags, mittwochs und freitags wurde das verbrauchte Medium vollständig durch frisches ersetzt. Die Subkultivierung erfolgte bei 70 bis 80% Konfluenz. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS – phosphate buffered saline; ohne  $\text{Ca}^{2+}$ , ohne  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden sie anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin/ 1 mM EDTA) 4 min im Brutschrank inkubiert. Die Digestion wurde durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die unterschiedlichen Experimente wurden die Caco-2 Zellen in der notwendigen Dichte ausgesät (Tab. 3.2). Ein Teil der Zellen wurde immer für die Stammerhaltung in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen, D) verwendet.

**Tab. 3.2: Caco-2 Zellen: Aussaat für Stammerhaltung und für Experimente**

	Zellen pro	
	Flasche	well bzw. Kammer
Flasche 75 cm <sup>2</sup>	1·10 <sup>6</sup> , 10 ml Medium	
Flasche 25 cm <sup>2</sup>	0,5·10 <sup>6</sup> , 6 ml Medium	
Quadriperm		1·10 <sup>6</sup> , 4 ml Medium
6-well Platte		0,5·10 <sup>6</sup> , 3 ml Medium
24-well Platte		1·10 <sup>5</sup> , 1,3 ml Medium
48-well Platte		0,5·10 <sup>5</sup> , 0,8 ml Medium

## 3.2 APC<sup>min/+</sup>-Maus

Die APC<sup>min/+</sup>-Maus bildet infolge eines fehlenden APC-Gens multiple intestinale Neoplasien (min – multiple intestinal neoplasia).

Über Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA) wurden weibliche APC<sup>min/+</sup>-Mäuse bezogen und zur weiteren Verwendung mit männlichen C57BL/6J Mäusen von Harlan Winkelmann (Borchen, D) verpaart. Die Haltung der Tiere erfolgte bei freiem Zugang zu Wasser und Futter bei einem 14 Stunden Tag/ 10 Stunden Nacht Rhythmus. Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen zu je vier bis fünf Tieren pro Käfig unterteilt. Einer Gruppe wurde 400 mg Flavon/kg Körpergewicht mittels einer Sonde verabreicht. Die zweite Gruppe erhielt nur das Vehikel Myrj 53 (Sigma Aldrich, Deisenhofen, D). Die Schlundierung erfolgte ab der siebten Lebenswoche täglich an fünf Tagen, gefolgt von zwei Ruhetagen über einen Zeitraum von vier Wochen. Für die Experimente wurden weibliche APC<sup>min/+</sup> Mäuse im Alter von 70 bis 100 Tagen genutzt. Die Mäuse wurden, gemäß den Richtlinien des Tierschutzes des Freistaates Bayern (AZ 55.2–1-54–2531.3–16-03), dekapitiert. Ein Teil der Mäuse (18 Tiere) wurde für immunhistochemische Versuche verwendet, während der andere Teil (10 Tiere) für Expressionsanalysen verwendet wurde. Hierfür wurde der Gastrointestinaltrakt (GIT) sofort mit eiskaltem Tris-Puffer (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol; pH 7,4) gespült, um Futter- und Kotreste zu entfernen. Anschließend wurde der GIT in seine Segmente unterteilt. Diese wurden auf einer Glasplatte platziert und der Länge nach eröffnet. Die Mukosa wurde anschließend mit einem eiskalten Objektträger abgetragen und in Lysepuffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bis zur Homogenisierung bei -80 °C.

Für die immunhistochemischen Versuche wurden die einzelnen Darmabschnitte nach ihrer Entnahme ebenfalls gewaschen und der Länge nach geöffnet, anschließend wurden sie aufgerollt und in Paraffin gebettet. Diese Arbeiten wurden am Institut für Toxicologie, Helmholtz-Zentrum, München, durchgeführt.

Zur Bestimmung der Anzahl und der Größe der Adenome wurden die Intestinalesegmente der Mäuse (Kontrolle: n=32, Flavon: n=26) der Länge nach eröffnet. Die nach oben zeigende Mukosa wurde mit Filterpapier bedeckt und sechs Stunden in p-Formaldehyd (PFA; 2% (w/v)) fixiert. Nachdem die Adenome 15 min mit Methylenblau angefärbt wurden, wurde bei 25facher Vergrößerung am Lichtmikroskop ihre Anzahl und Größe bestimmt. Diese Arbeiten erfolgten ebenfalls am Institut für Toxicologie des Helmholtz-Zentrums in München.

### **3.3 Nachweis der Expression der ABC-Transporter mittels Western Blot**

#### **3.3.1 Gewinnung von Membranen und Zytosol aus Caco-2 Zellen**

Die Caco-2 Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen 48 Stunden nach Aussähen mit den Effektoren für weitere 48 Stunden inkubiert.

Um P-gp, MRP-2 und BCRP darstellen zu können, wurden die Zellen 2 min mit PBS/EDTA (0,2% EDTA (v/v)) auf Eis gewaschen und mittels eines Zellschabers vom Boden gelöst. Im Anschluß wurden sie mind. 24 Stunden in Lysepuffer bei -80 °C eingefroren. Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut wurden, wurden sie mit 20 bis 30 „strokes“ ebenfalls auf Eis mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators homogenisiert. Die Proben wurden hierauf folgend 20 min bei 4 °C und 450 g zentrifugiert, um die Zelltrümmer vom Zytoplasma und den Zellmembranen abzutrennen. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde 20 min bei 4 °C und 40000 g zentrifugiert. Durch diesen zweiten Zentrifugationsschritt bildete sich ein Pellet, in welchem sich die Zellmembranen befanden. Dieses Pellet wurde in Membranpuffer aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

Um zytosolisches  $\beta$ -Catenin im Western Blot darstellen zu können, wurden die Zellen ebenfalls unter Verwendung eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst,

um anschließend 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert zu werden. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl RIPA-Puffer zwecks Lyse aufgenommen und 15 min auf Eis geschüttelt. Um Zellbruchstücke, DNA und RNA sedimentieren zu lassen, wurde die Suspension 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, so daß sich die zytosolischen Proteine im Überstand finden.

Der Proteingehalt wurde photometrisch bei 595 nm mit dem BioRad Proteinassay (BioRad, München, D) bestimmt.

### **3.3.2 Gewinnung von Membranen aus Darmproben von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen**

Die in Lysepuffer aufgenommenen Proben wurden auf Eis aufgetaut und ebenfalls mit 20 bis 30 „strokes“ homogenisiert und 20 min bei 450 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde weitere 20 min bei 4 °C und 40000 g zentrifugiert. Das entstandene Membranpellet wurde in Membranpuffer aufgenommen und anschließend wurde auch hier der Proteingehalt bei 595 nm photometrisch mit dem BioRad Proteinassay bestimmt.

### **3.3.3 Methoden der Analyse**

#### *3.3.3.1 SDS-Gelelektrophorese*

In einem „Mini Protean3 Cell“-Komplettsystem (BioRad, München, D) wurden jeweils 30 µg des Proteingemisches pro Vertiefung eines 8,5%igen Acrylamidgeles (Zusammensetzung siehe Tab. 3.3) aufgetragen. Die entsprechende Menge der Proteinprobe wurde zuvor mit der doppelten Menge dreifach konzentrierten Lämmli-puffers versetzt und 15 min bei 55 °C im Wasserbad denaturiert. Vor dem Gießen der Gele wurden zunächst alle Materialkomponenten, welche in Kontakt mit dem Gel traten, mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt, um die Oberflächen von Staub und weiteren Verunreinigungen zu befreien. Durch Zugabe von NNN'-Tetramethylethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) wurde die Polymerisation der Gele gestartet und die noch flüssigen Gele wurden unverzüglich in die Polymerisationskammern gegossen. Die Übersichtung des Trenngels mit Isopropanol bewirkte hierbei eine gleichmäßige Verteilung des Gels in der Kammer. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol wieder entfernt und das Sammelgel angesetzt. Dieses wurde nach erfolgter Polymerisation



des Trenngels auf dieses geschichtet. Um die für das Auftragen der Proteinproben nötigen Taschen zu formen wurde das Gel letztlich mit einem Kamm luftdicht abgeschlossen. Im gewählten Trenngel lassen sich Proteine zwischen 43 kDa und 200 kDa auftrennen. Die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Sobald die Laufront gerade das Gel verlassen hatte, wurde der Lauf beendet.

**Tab. 3.3: Zusammensetzung der Acrylamidgele**

Chemikalie	Konzentration	verwendetes Volumen	
		Trenngel	Sammelgel
Tris-HCl (pH 8,8)	1, % M	3 ml	-
Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M	-	1 ml
SDS	10% (w/v)	120 µl	40 µl
Acrylamidlösung	30% (w/v)	3,4 ml	680 µl
Aqua bidest		5,44 ml	2,24 ml
APS	10% (w/v)	160 µl	40 µl
TEMED		7 µl	2 µl

(Tris – 2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol, SDS – Natriumdodecylsulfat )

### 3.3.3.2 Western Blotting

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel im „Semidry“ Verfahren geblottet. Eine der Größe des Trenngels gleich große Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde zuerst in Methanol aktiviert und dann in Blotpuffer nach Towbin [118] äquilibriert. Die Membran wurde auf das Gel gelegt und beide wurden von jeweils drei Lagen in Blotpuffer äquilibriertem Whatman-Papier umschlossen. Dieses Sandwich wurde in einem Semidry Blotter (Owl, Portsmouth, USA) zwei Stunden bei 23 V geblottet. Nach dem Blotting wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in einer 1%igen (w/v) Milchpulverlösung in TBS-T (Tris buffered saline + Tween 20) inkubiert, damit unspezifische Bindungsstellen abgesättigt werden. Anschließend wurde die Membran zweimal 5 min in TBS-T gewaschen. Die Detektion von  $\beta$ -Catenin, P-gp, MRP-2, BCRP sowie  $\beta$ -Aktin erfolgte durch die Anlagerung der jeweiligen Antikörper (Tab. 3.4). Hierzu wurde der Blot zwei Stunden mit dem primären Antikörper auf dem Plattenschüttler inkubiert. Die folgenden Schritte bestanden darin, den Blot dreimal für 5 min in TBS-T zu waschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit den Antikörpern

erfolgte auf einem Plattenschüttler bei 220 rpm. Nachfolgend wurde jeweils zweimal für 5 min mit TBS-T bzw. mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch eine „enhanced chemoluminescence“-Reaktion nach Thorpe und Kricka [119]. Luminol wird hierbei durch die an die sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase oxidiert und das letztlich entstehende 3-Aminophtalat besitzt Elektronen im angeregten Zustand. Durch die Rückkehr dieser Elektronen in den Ruhezustand wird Licht emittiert, welches den Film (Hyperfilm, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) schwärzt. Die Entwicklung des Filmes erfolgte in einem Optimax X-Ray Film Processor (Protec Medizintechnik, Obersteinfeld, D).

Damit auf derselben Membran auch das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin nachgewiesen werden konnte, wurden die bereits gebundenen Antikörper in Strippuffer (45 min, 55 °C) wieder von der Membran gelöst und anschließend mit PBS-T (phosphate buffered saline + Tween 20) gewaschen. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4 °C in einer Milchpulverlösung (1% (w/v) in TBS-T) inkubiert. Die Detektion von  $\beta$ -Aktin erfolgte analog zum Nachweis von  $\beta$ -Catenin, P-gp, MRP-2 und BCRP.

Mit Hilfe der Software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA) wurde die Intensität der Proteinbanden densitometrisch bestimmt.

**Tab. 3.4: In Western Blot-Experimenten verwendete Antikörper**

primäre Antikörper	Quelle	Verdünnung
P-gp	rabbit-polyclonal IgG (Santa Cruz, Heidelberg, D)	1:500
MRP-2	rabbit-polyclonal IgG (Santa Cruz, Heidelberg, D)	1:50
BCRP	rabbit-polyclonal IgG (Santa Cruz, Heidelberg, D)	1:50
$\beta$ -Aktin	rabbit anti-actin affinity isolated antibody IgG (Sigma Aldrich, Steinheim, D)	1:500
$\beta$ -Catenin	monoclonal mouse-anti- $\beta$ -Catenin (BD biosciences, Heidelberg, D)	1:1000

sekundäre Antikörper	Quelle	Verdünnung
anti-mouse IgG	goat-anti-mouse IgG, biotinyliert (Vector laboratories, München, D)	1:1000
anti-rabbit IgG	goat-anti-rabbit IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert, (Santa Cruz, Heidelberg, D)	1:1000

### 3.4 Immunfluoreszenznachweis von $\beta$ -Catenin und ABC-Transportern

#### 3.4.1 Vorbereitung der Caco-2 Zellen für die immunhistochemische Darstellung von $\beta$ -Catenin

Um zu verhindern, dass sich die Caco-2 Zellen im Laufe des Experiments von den Objektträgern ablösen, wurden die Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnung der Poly-L-Lysin Lösung in ein Quadriperm gegeben und die Objektträger wurden in dieser Lösung inkubiert. Die Objektträger wurden nach 5 min in frische Quadriperm überführt und bei 60 °C eine Stunde im Trockenschrank getrocknet. Die Inkubation mit den Effektoren umfasste auch in diesem Experiment standardmäßig 48 Stunden, nachdem die Zellen zuvor innerhalb von 48 Stunden etwa 80% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wurden dreimal mit 5 ml TBS-T gewaschen und anschließend mit kaltem PFA (4% (w/v)) auf Eis inkubiert. Nach 30 min wurde die Fixierung beendet und die Zellen wurden dreimal mit 5 ml TBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen 30 min in 3% (v/v) Ziegenerum in TBS-T inkubiert.

#### 3.4.2 Vorbereitung der intestinalen Gewebeschnitte von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen zur immunhistochemischen Darstellung von $\beta$ -Catenin, P-gp, MRP-2 und BCRP

Die einzelnen Segmente des GIT der APC<sup>min/+</sup>-Mäuse wurden von Mitarbeitern des Helmholtz-Zentrums, München, entnommen, fixiert und in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden 3  $\mu$ m dicke Schnitte hergestellt. Nach dem Schneiden mit einem Rotations-Mikrotom (Reichert-Jung, 2030 Biocut, Wien, A) wurden die Schnitte in ein 40 °C warmes Wasserbad, dem 1% (v/v) Hühnereiweiß-Glycerin zugesetzt war, abgestreift und anschließend auf einem Objektträger

aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C in einem Trockenschrank getrocknet. Um sie zu entparaffinieren, wurden sie zunächst in Xylol und anschließend in einer Ethanolkonzentrationskette inkubiert. Das Inkubationschema ist in Tab. 3.5 dargestellt.

**Tab. 3.5: Lösungsmittelkette zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte**

Schritt	Lösung	Zeit
1.	Xylol	1 x 10 min
	(entparaffinieren)	1 x 5 min
2.	Ethanol 100%	2 x 5 min
3.	Ethanol 100%	1 min
4.	Ethanol 96%	2 x 1 min
5.	Ethanol 70%	5 min
6.	fließendes Wasser	3 min

Nachdem die Schnitte in fließendem Wasser gewaschen wurden, wurden sie sofort in einen Mikrowellenschnellkochtopf (Nordic Ware, Minneapolis, USA) mit 1,5 l Citratpuffer (pH 6,0) gegeben, um die durch das Fixieren mit Formalin und PFA verursachte Vernetzung der Oberflächenstrukturen im Gewebe zu lösen und das Gewebe für die Färbung zugänglich zu machen. Nach einer Kochzeit von 33 min bei 800 W wurden die Schnitte in 5% (v/v) Ziegenserum in TBS blockiert, um evtl. freigewordene unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Nach einer Stunde wurden die Objektträger aus dem Blockierungspuffer genommen, rund um das Gewebe getrocknet und die Gewebeschnitte mit einem PAP-Pen umrandet.

### **3.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von $\beta$ -Catenin, P-gp, MRP-2 und BCRP**

#### *3.4.3.1 Nachweis von $\beta$ -Catenin in Caco-2 Zellen*

Im Anschluss an die Inkubation in Ziegenserum wurden die Objektträger nun in frische Quadriperm gelegt und die Antikörperlösungen wurden auf die Zellen gegeben. Pro Objektträger wurden 500  $\mu$ l Antikörperlösung (1:500 in 3% (v/v) Ziegenserum in TBS-T) benötigt. Die Quadriperm wurden zwei Stunden bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nachdem sie viermal in 5 ml TBS-T je 5 min gewaschen wurden, fand die Inkubation mit dem sekundären, biotinylierten Antikörper (1:200, in 3% (v/v) Ziegenserum in TBS-T) statt. Diese erfolgte eine Stunde bei RT in einer Feuchtkammer. Die Zellen wurden nun je zweimal in 5 ml

TBS-T bzw. TBS geschüttelt. Daraufhin wurden die Objektträger wieder in trockene Quadriperm gelegt und mit je 500 µl Cy5-Streptavidin/Sytox Green Lösung (1:500 Cy5-Streptavidin, 0,25 µM Sytox Green) lichtgeschützt 15 min inkubiert. Nachdem die Zellen noch viermal mit 5 ml TBS-T je 5 min gewaschen wurden, wurden Eindeckelmedium und Deckgläschen auf die Objektträger gegeben und diese über Nacht lichtgeschützt trocknen gelassen. Die gefärbten Zellen wurden am nächsten Tag mittels eines Konfokal-Lasermikroskops (DMIBRE Leica, Wetzlar, D) bei 630facher Vergrößerung betrachtet. Die Antikörperfärbung wurde nach Anregung bei 633 nm in einem Emissionsbereich von 645 bis 720 nm detektiert. Die Anregung des DNA-Farbstoffs Sytox Green erfolgte bei 488 nm und die Detektion im Emissionsbereich von 500 bis 535 nm.

#### 3.4.3.2 Immunhistochemie in *APC<sup>min/+</sup>*-Mäusen

Pro Schnitt wurden je nach Größe 100 bis 150 µl Antikörperlösung eingesetzt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei RT über Nacht in einer Feuchtkammer. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min in TBS wird der Objektträger rund um das Gewebe wieder abgetrocknet. Die Objektträger wurden wieder in die Feuchtkammer gelegt und es wurde eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Tab. 3.6 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Antikörper, sowie deren verwendete Verdünnungen. Alle Antikörper wurden in TBS, dem 5% (v/v) Ziegenserum zugesetzt war, verdünnt. Die Schnitte wurden zweimal je 5 min in TBS gewaschen und anschließend je nach Bedarf mit Streptavidin gekoppeltem Cy5 in einer 1:1000 Verdünnung für 15 min in der Feuchtkammer inkubiert. Letztlich wurden noch Eindeckelmedium und Deckgläschen auf die Schnitte gegeben.

**Tab. 3.6: Immunhistochemisch eingesetzte Antikörper**

primäre Antikörper	Quelle	Verdünnung
P-gp	rabbit-polyclonal IgG (Santa Cruz, Heidelberg, D)	1:500
MRP-2	rabbit-polyclonal IgG (Santa Cruz, Heidelberg, D)	1:200
BCRP	rabbit-polyclonal IgG (Santa Cruz, Heidelberg, D)	1:200
β-Aktin	rabbit-polyclonal IgG (Sigma Aldrich, Steinheim, D)	1:1000

<b>primäre Antikörper</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>
cleaved caspase-3	rabbit-polyclonal IgG (Cell Signaling, Frankfurt, D)	1:200
$\beta$ -Catenin	monoclonal mouse-anti- $\beta$ -Catenin (BD biosciences, Heidelberg, D)	1:1000
<b>sekundäre Antikörper</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-mouse IgG	goat-anti-mouse IgG, biotinyliert (Vector laboratories, München, D)	1:200
anti-rabbit IgG	Alexa-Fluor 488-conjugated, (Invirogen, Karlsruhe, D)	1:200

### 3.5 Charakterisierung der ABC-Transporteraktivität

Um die Aktivität der ABC-Transporter überprüfen zu können, wurden die Caco-2 Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin-123 (P-gp), CMFDA (MRP-2) und Hoechst-33342 (BCRP) beladen. Die gewählten Farbstoffe stellen jeweils Substrate der zugeordneten Transporter dar. Der Anteil der einzelnen Transporter am Gesamttransport wurde durch die Verwendung selektiver Inhibitoren bestimmt. Als Inhibitoren wurden für P-gp Verapamil, für MRP-2 MK-571 und für BCRP Fumitremorgin c (FTC) eingesetzt. In den durchgeführten Experimenten wurden die Zellen in 48-well Platten ausgesät. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 48 Stunden wurde es durch Krebspuffer, dem die Effektoren zugesetzt waren, ersetzt. Die Inkubation erfolgte 180 min im Brutschrank. In Tab. 3.7 sind die eingesetzten Farbstoffe, Effektoren und Inhibitoren dargestellt. Nach der Inkubation wurden die Effektoren auf Eis abgesaugt und zweimal mit 250  $\mu$ l eiskaltem Krebspuffer gewaschen. Die Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin-123 und CMFDA wurden nach Anregung bei 485 nm bei einer Emissionswellenlänge von 538 nm gemessen. Bei Hoechst-33342 wurde eine Anregungswellenlänge von 355 nm und eine Emissionswellenlänge von 460 nm gewählt.

Die Akkumulation des Zytostatikums Topotecan wurde anhand seiner Eigenfluoreszenz detektiert und nach Anregung bei 355 nm bei 538 nm Emissionswellenlänge bestimmt.

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Reader (Fluoroskan, Thermo Electron, Dreieich, D).

**Tab. 3.7: Konzentrationen der für die Bestimmung der ABC-Transporteraktivität verwendeten Farbstoffe, Effektoren und Inhibitoren**

Fluoreszenzfarbstoffe	Konz. / $\mu\text{M}$	Effektoren	Konz / $\mu\text{M}$	Inhibitoren	Konz / $\mu\text{M}$
Rhodamin-123	1	Flavon	250	Verapamil	40
CMFDA	1	Chrysin	250	MK-571	50
Hoechst-33342	1	Topotecan	25	FTC	10

## 3.6 Bestimmung von Apoptose-Parametern

### 3.6.1 Bestimmung der Caspase-Aktivität *in vitro* und aktiver Caspase *in vivo*

#### 3.6.1.1 Nachweis der Aktivität der Caspasen-3 und -8 in Caco-2 Zellen

Zur Bestimmung der Aktivität der Caspase-3 und der Caspase-8 wurde der EnzChek Caspase-3 Assay # Kit 1 (Invitrogen, Karlsruhe, D) mit spezifischen Caspase-3 bzw. Caspase-8 Substraten verwendet. Als Substrat für die Caspase-3 wurde das 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) gebundene Substrat Z-DEVD-AMC hinzugefügt, das nach Spaltung durch die Caspase-3 fluoresziert (Ex: 342 nm, Em: 441 nm). Durch Einsatz des Inhibitors Z-DEVD-CHO wurde die Spezifität überprüft. Eine Aktivierung der Caspase-8 bewirkt durch proteolytische Spaltung eine Aktivierung der Caspase-3, weswegen auch die Caspase-8-Aktivität ermittelt wurde. Caspase-8 weist eine hohe Spezifität für das Peptid Ile-Glu-Thr-Asp (IETD) auf und entsprechend konnte nach Zugabe des Substrates Ac-IETD-AFC deren Aktivität fluoreszenzoptisch bestimmt werden (Ex: 400 nm, Em: 520 nm).

Die Caco-2 Zellen wurden zu Bestimmung der Caspase-Aktivität in 6-well Platten ausgesät. Nachdem die Zellen 48 Stunden adhärten, wurde das alte Medium durch frisches Medium, dem die Effektoren zugesetzt waren, ersetzt. Vor der Ernte wurden die Zellen mit 2 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ , ohne  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Anschließend wurden sie 4 min mit 1 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert. Der Trypsinierungsprozess wurde durch die Zugabe von 2 ml Medium unterbrochen. Die vereinzelter Zellen wurden in ein 15 ml-Röhrchen überführt und mit PBS (ohne

$\text{Ca}^{2+}$ , ohne  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Kammer bestimmt.

Es wurden jeweils 200.000 Zellen für eine Bestimmung eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen in 50  $\mu\text{l}$  Lysepuffer aufgenommen und nachdem sie 30 min auf Eis inkubierten, wurden die lysierten Zellen zentrifugiert (5 min, 4500 g). Aus dem Überstand wurden 50  $\mu\text{l}$  entnommen und in eine 96-well Platte überführt. Als Reaktionslösung wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Z-DEVD-AMC Lösung bzw. einer 10 mM Ac-IETD-AFC Lösung mit 980  $\mu\text{l}$  doppelt konzentriertem Reaktionspuffer versetzt. Durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  dieser Reaktionslösung wurde die Reaktion gestartet. Anschließend wurde die 96-well Platte 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte in Intervallen von jeweils 20 min über einen Zeitraum von 5 Stunden in einem Mikrotiterplatten-Reader (Fluoroskan, Thermo Electron, Dreieich, D; AMC: Ex: 355 nm, Em: 460 nm bzw. AFC: Ex: 355 nm, Em: 538 nm)

#### *3.6.1.2 Nachweis aktivierter Caspase in intestinalen Zellen von $\text{APC}^{\text{min/+}}$ -Mäusen*

Der Nachweis Caspase-aktiver Zellen in Gewebeschnitten der  $\text{APC}^{\text{min/+}}$ -Maus erfolgte analog dem Nachweis der ABC-Transporter und dem von  $\beta$ -Catenin. Die verwendeten Antikörper sind Tab. 3.6 zu entnehmen.

### **3.6.2 DNA-Fragmentierung**

Caco-2 Zellen wurden in einem Quadriperm auf Objektträgern ausgesät. Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium, dem die entsprechenden Effektoren zugesetzt wurden, ersetzt. Die Flavonoide wurden, falls nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  verwendet, während Topotecan immer 25  $\mu\text{M}$  verwendet wurde. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und die Zellen 10 min mit 500  $\mu\text{l}$  PFA (2% (w/v)) fixiert. Anschließend wurde wieder gewaschen und die Zellkerne wurden mit 500  $\mu\text{l}$  Sytox Green (0,05  $\mu\text{M}$ ) angefärbt. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen wurde noch einmal mit PBS gewaschen und die Objektträger unter Verwendung von Eindeckelmedium mit einem Deckgläschen abgedeckt und über Nacht zum Trocknen gelagert. Die angefärbten Zellkerne wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Axioskop 2, Zeiss, Wetzlar, D) visualisiert. In der späten



Phase der Apoptose lassen sich die „apoptotic bodies“ leicht als Chromatinabschnürungen vom Zellkern erkennen. Anhand von sechs repräsentativen Aufnahmen aus verschiedenen Bereichen des Objektträgers wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen durch Auszählen nach Formel (3.1) bestimmt.

$$AR = \frac{Z_a}{Z_{ges}} \cdot 100$$

#### **Berechnung der Apoptoserate**

(3.1)

AR – Apoptoserate

$Z_a$  – Anzahl apoptotischer Zellen

$Z_{ges}$  – Gesamtzellzahl

### **3.7 Proliferation**

Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Caco-2 Zellen in 6-well Platten ausgesät und nach 48 Stunden das Medium gewechselt. Anschließend wurden sie für weitere 48 Stunden mit den entsprechenden Effektoren inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 2 ml PBS (ohne  $Ca^{2+}$ , ohne  $Mg^{2+}$ ) gewaschen und hiernach mit 1 ml Trypsin 4 min im Brutschrank inkubiert. Der Verdau wurde nach Zugabe von 2 ml Medium unterbrochen. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt.

### **3.8 Differenzierung**

In Säugerzellen lässt sich anhand der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) der Differenzierungsgrad bestimmen. Je stärker die Zellen differenzieren, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß sie ungehemmt proliferieren.

In 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen wurden jeweils  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen ausgesät und nach 48 Stunden weitere 48 Stunden mit den entsprechenden Effektoren inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (ohne  $Ca^{2+}$ , ohne  $Mg^{2+}$ ) gewaschen und anschließend trypsiniert. Hierzu wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin bei 37 °C

inkubiert. Der Verdauungsprozess wurde nach 2 min durch Zugabe von Medium beendet. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette durchgemischt, wodurch sie vereinzelt wurden und zentrifugiert (5 min, 300 g, RT). Das entstandene Pellet wurde bei -80 °C über Nacht eingefroren. Die Pellets wurden auf Eis aufgetaut und in Diethanolamin (DEA)-Puffer aufgenommen. Die Homogenisierung erfolgte unter Verwendung eines motorgetriebenen Glas-Teflon-Homogenisators mittels 20 bis 30 „strokes“ auf Eis. Der Proteingehalt wurde anschließend durch den BioRad Proteinassay bestimmt. Um die AP-Aktivität zu bestimmen, wurde 4-Nitrophenylphosphat (4-NPP) als Substrat verwendet und die pro Zeiteinheit und mg Protein gebildete Menge an p-Nitrophenol ermittelt. Die p-Nitrophenolmenge wurde photometrisch bei 405 nm im Spektralphotometer nachgewiesen und über 10 min gemessen. Hierzu wurden 940 µl DEA-Puffer mit 50 µl Probe, sowie 10 µl 4-NPP gemischt.

### **3.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung**

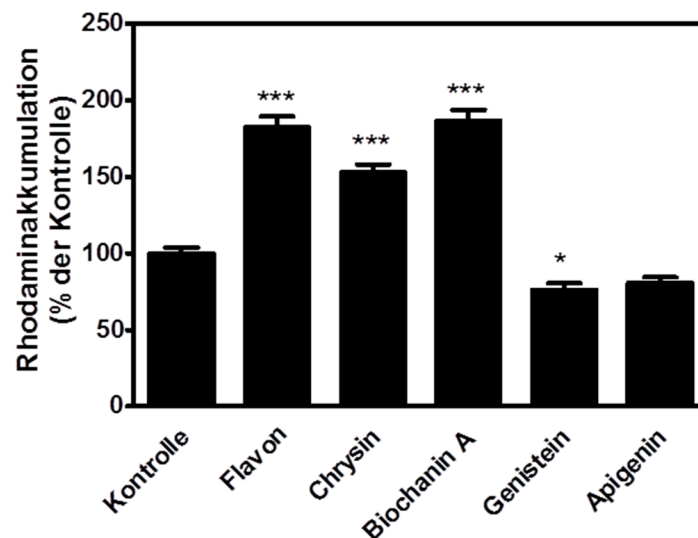
Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Auswertung zweier Gruppen wurde der students t-Test (zweiseitig, ungepaart) angewandt. Für die Vergleiche mehrerer Gruppen wurde die One-way-ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Test herangezogen. Die statistische Auswertung erfolgte, ebenso wie die graphische Darstellung, mit dem Computerprogramm GraphPad 4.0 (GraphPad Software, Los Angeles, USA). Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $< 0,05$  gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Flavonoide als Inhibitoren der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP in Caco-2 Zellen

#### 4.1.1 Dosis-Wirkungs-Berechnungen von Flavon und Chrysin bezüglich der Akkumulation von Substraten des P-gp, MRP-2 und BCRP

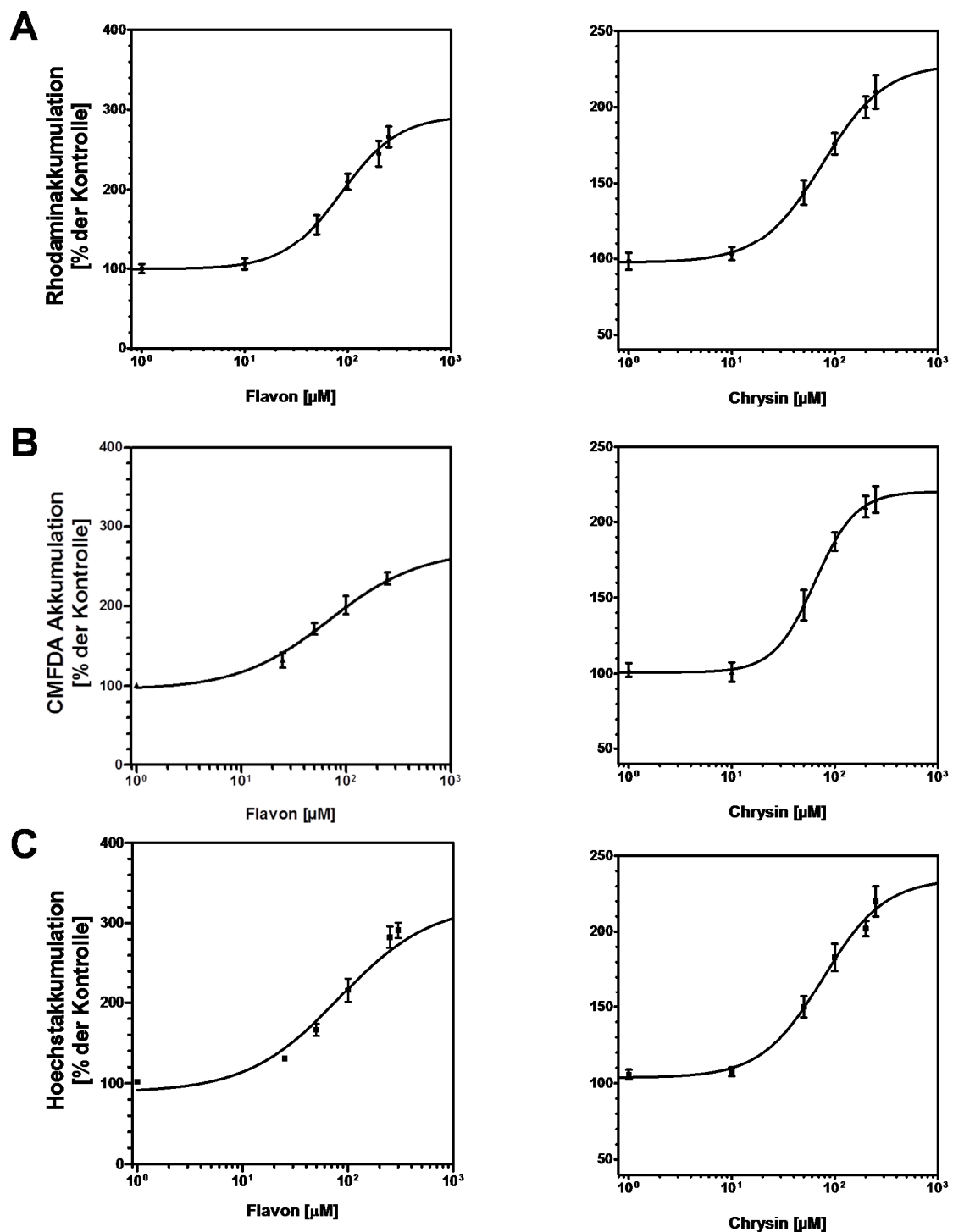
Um zu überprüfen, ob Flavonoide ATP-abhängige Effluxpumpen hemmen, wurde der Flavonoideffekt auf den Efflux eines P-gp spezifischen Substrats untersucht. Hierzu wurden die Caco-2 Zellen drei Stunden mit 250  $\mu\text{M}$  fünf ausgewählter Flavonoide in Gegenwart des fluoreszierenden P-gp Substrats Rhodamin-123 (1  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Flavonoide Flavon ( $182,1 \pm 7,2\%$ ,  $p < 0,001$ ), Chrysin ( $152,8 \pm 5,3\%$ ,  $p < 0,001$ ) und Biochanin A ( $186,8 \pm 7,0\%$ ,  $p < 0,001$ ) bewirkten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen deutlichen Anstieg der Rhodaminakkumulation, wie anhand der gemessenen intrazellulären Fluoreszenz ermittelt wurde (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Modulation der P-gp Aktivität durch Flavonoide**

Veränderung der P-gp Aktivität nach Inkubation mit ausgewählten Flavonoiden. Die Flavonoide wurden drei Stunden in einer Konzentration von jeweils 250  $\mu\text{M}$  appliziert ( $n=12$ ). Danach wurde die Akkumulation von Rhodamin anhand dessen Fluoreszenz bei 470 nm Anregung und 520 nm Emission bestimmt (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  versus Kontrolle).

Zusätzlich sollte der Einfluss von Flavon und Chrysin auf die drei ABC-Transporter in Abhängigkeit ihrer applizierten Dosis ermittelt werden (Abb. 4.2).



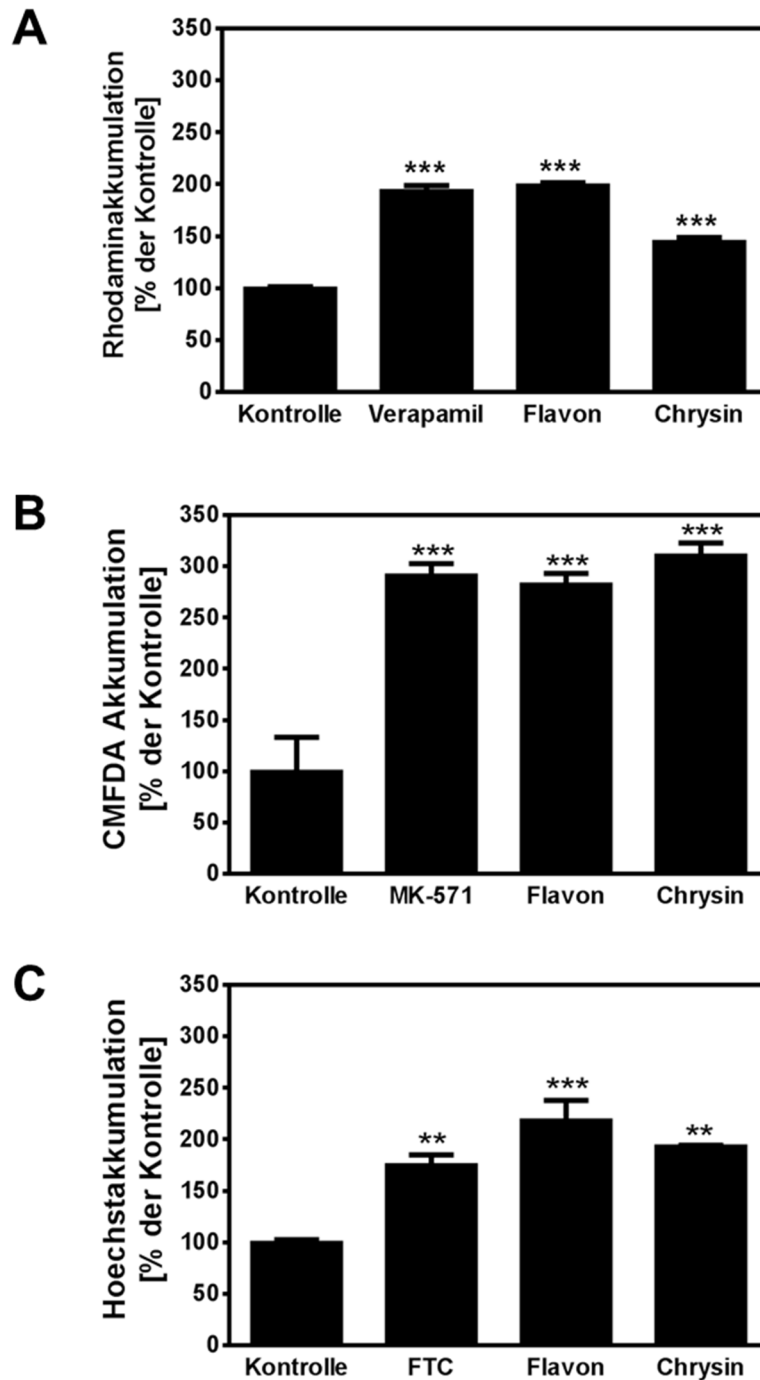
**Abb. 4.2: Dosisabhängige Inhibition der ABC-Transporter P-gp, BCRP und MRP-2 durch Flavon und Chrysin**

Caco-2 Zellen wurden drei Stunden mit jeweils 1 µM Rhodamin (A), CMFDA (B) oder Hoechst-33342 (C) inkubiert. Anschließend wurde die Akkumulation der Fluoreszenzfarbstoffe in den Caco-2 Zellen bei steigenden Flavon- und Chrysinkonzentrationen bestimmt (Rhodamin-123, CMFDA: Ex. 485 nm, Em: 538 nm; Hoechst-33342: Ex: 355 nm, Em: 460 nm).

Flavon wie auch Chrysin führten zu einer deutlich dosisabhängigen Steigerung der Akkumulation des P-gp Substrates Rhodamin, des MRP-2 Substrates CMFDA und des BCRP Substrates Hoechst-33342. Sowohl für Flavon wie auch für Chrysin wurden mittlere effektive Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) im Bereich von 50 - 85  $\mu$ M für alle drei Transporter ermittelt.

#### **4.1.2 Nachweis einer spezifischen Interaktion der beiden Flavonoide Flavon und Chrysin mit den ABC-Transportern P-gp, MRP-2 und BCRP**

Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren der Transporter-Proteine P-gp, MRP-2 und BCRP soll ihre Beteiligung am Efflux von fluoreszierenden Substraten näher charakterisiert werden. Flavon bewirkt einen Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Rhodamin-123 ( $199,4 \pm 1,2\%$ ) gleichwertig wie der spezifische P-gp Inhibitor Verapamil ( $193,8 \pm 2,8\%$ ). Chrysin vermittelt hier einen moderateren Fluoreszenzanstieg ( $145,0 \pm 2,2\%$ ). Das MRP-2 Substrat CMFDA akkumuliert durch den spezifischen Inhibitor MK-571 ( $291,4 \pm 6,4\%$ ) in etwa gleichem Maße wie durch die Flavonoide Flavon ( $282,7 \pm 6,0\%$ ) und Chrysin ( $311,2 \pm 6,7\%$ ). Fumitremorgin c (FTC;  $175,5 \pm 5,5\%$ ) bewirkt eine Akkumulationssteigerung des BCRP Substrates Hoechst-33342 (Abb. 4.3). Beide Flavonoide zeigen auf die Akkumulation der Fluoreszenzsubstrate vergleichbare Wirkungen wie die spezifischen Inhibitoren der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP.



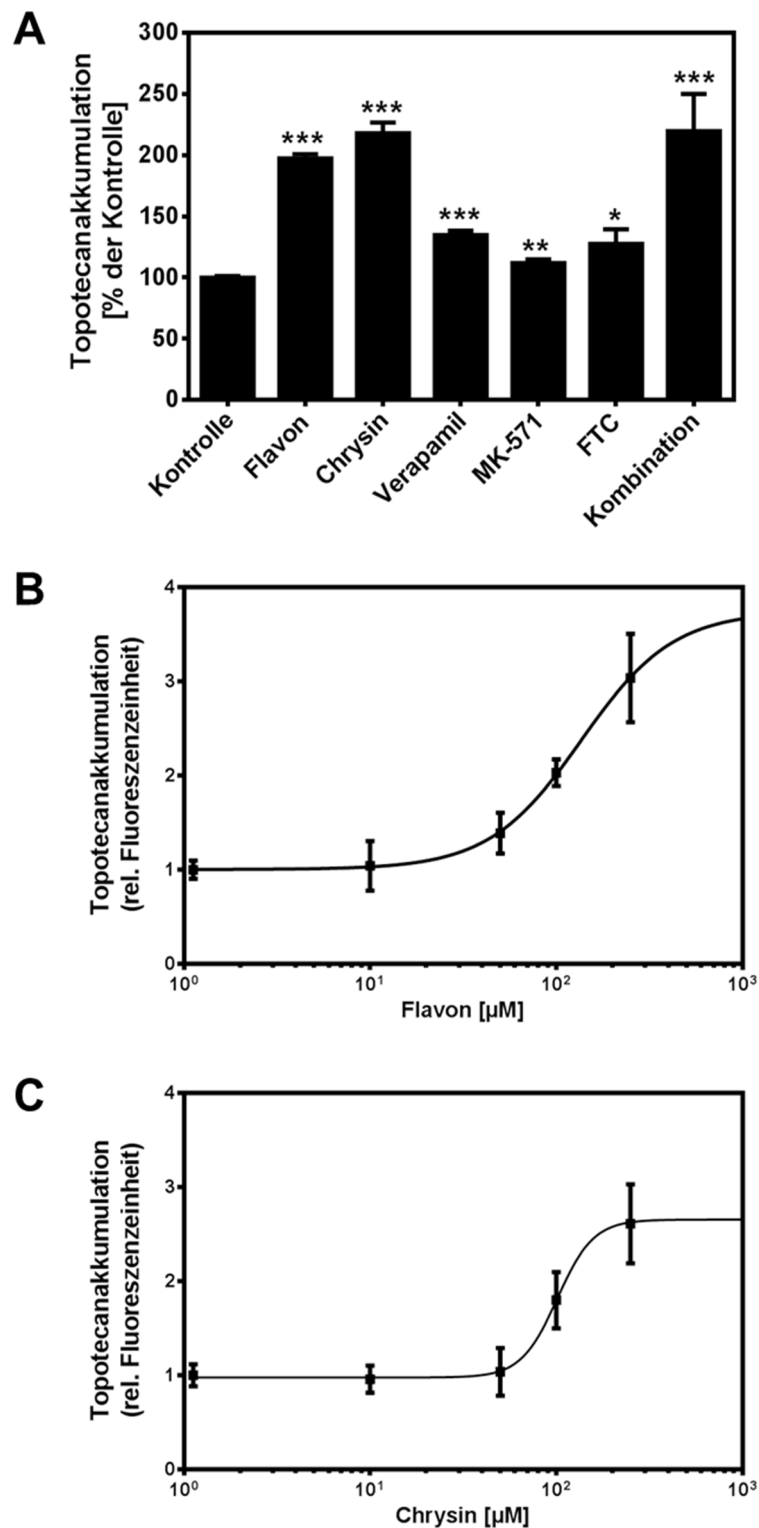
**Abb. 4.3: Modulation der Aktivität der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP durch spezifische Inhibitoren sowie Flavon und Chrysin**

Caco-2 Zellen wurden drei Stunden mit jeweils 1  $\mu$ M Rhodamin (**A**), CMFDA (**B**) oder Hoechst-33342 (**C**) inkubiert. Anschließend wurde die Akkumulation der Fluoreszenzfarbstoffe in den Caco-2 Zellen bestimmt. 250  $\mu$ M Flavon bzw. 250  $\mu$ M Chrysin bewirken vergleichbare Fluoreszenzanstiege wie die spezifischen Inhibitoren der ABC-Transporter. Als P-gp Inhibitor wurde 40  $\mu$ M Verapamil, als MRP-2-Inhibitor 50  $\mu$ M MK-571 und als BCRP-Inhibitor 10  $\mu$ M Fumitremorgin c (FTC) eingesetzt. (Rhodamin-123, CMFDA: Ex. 485 nm, Em: 538 nm; Hoechst-33342: Ex: 355 nm, Em: 460 nm).

### *Effekte der Flavonoide Flavon und Chrysin auf die Akkumulation des Tumortherapeutikums Topotecan*

Um den Einfluß einer Hemmung der ABC-Transporter auf die Akkumulation des P-gp, MRP-2 und BCRP Substrats Topotecan zu untersuchen, wurde dessen Akkumulation durch Detektion seiner Eigenfluoreszenz in den Caco-2 Zellen bestimmt. Die Inhibierung aller ABC-Transporter mittels spezifischer Inhibitoren bewirkte einen Anstieg der Topotecanakkumulation in den Karzinomzellen. Keiner der drei Inhibitoren erhöhte alleine die intrazelluläre Konzentration des Topoisomerase-I-hemmers Topotecan in dem Maße, wie die Flavonoide Flavon und Chrysin.

Das Zytostatikum Topotecan wird durch Verapamil ( $134,8 \pm 3,5\%$ ) deutlich weniger in den Caco-2 Zellen akkumuliert als durch Flavon ( $197,4 \pm 3,4\%$ ) oder durch Chrysin ( $218,0 \pm 8,7\%$ ). MK-571 verursacht zwar einen signifikanten Anstieg der Topotecanakkumulation in Caco-2 Zellen ( $111,7 \pm 3,1\%$ ), allerdings ist dieser nur etwa halb so groß wie der Flavonoid vermittelte Anstieg. FTC bewirkt nur einen moderaten Anstieg der Topotecanakkumulation ( $127,7 \pm 11,9\%$ ). Ein vergleichbarer Anstieg der Topotecanakkumulation wie unter Flavon und Chrysin wird erst durch die Kombination der Inhibitoren ( $219,6 \pm 30,6\%$ ,  $p < 0,001$ ) erreicht (Abb. 4.4 (A)). Des Weiteren zeigt sich die Topotecanakkumulation dosisabhängig mit  $EC_{50}$ -Werten von  $135,5 \pm 2,8 \mu M$  für Flavon und  $101,1 \pm 1,7 \mu M$  für Chrysin (Abb. 4.4 (B)-(C)) im Bereich der für den Transport spezifischer Substrate von P-gp, MRP-2 und BCRP ermittelten  $EC_{50}$ -Werte von Flavon und Chrysin (Abb. 4.2).



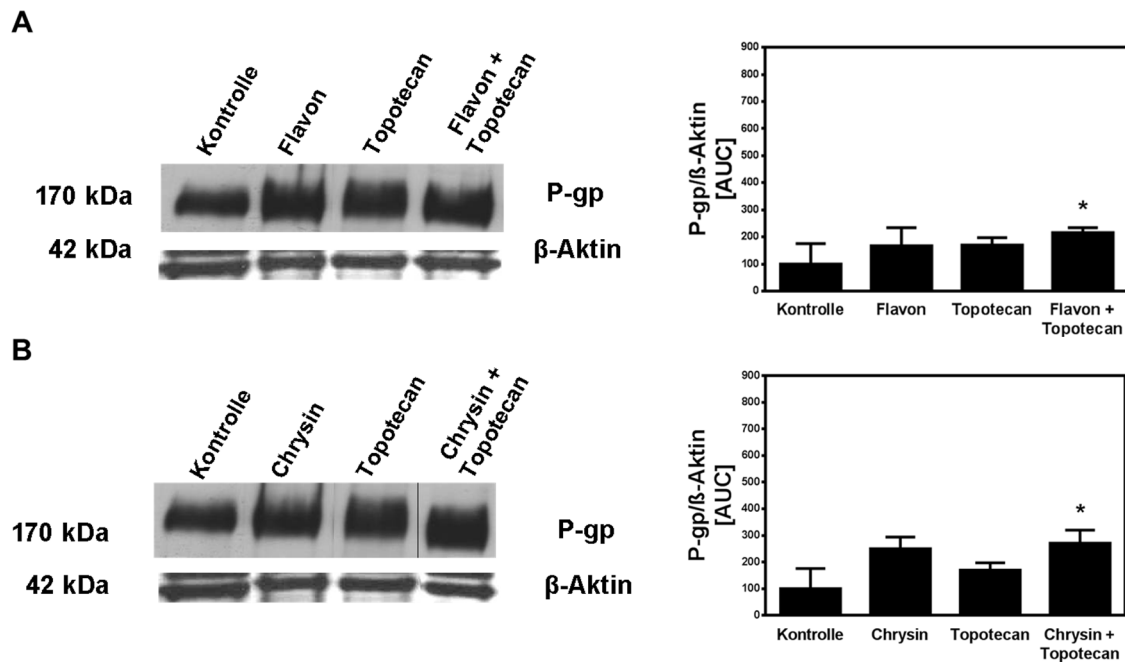
**Abb. 4.4: Flavon und Chrysin erhöhen die Topotecankonzentration in Caco-2 Zellen**

Die Zellen wurden drei Stunden mit 25  $\mu$ M Topotecan in Abwesenheit (Kontrolle, n=10), oder zzgl. 250  $\mu$ M Flavon (n=12), 250  $\mu$ M Chrysin (n=11), 40  $\mu$ M Verapamil (n=12), 50  $\mu$ M MK-571 (n=12), 10  $\mu$ M FTC bzw. der Kombination der Inhibitoren inkubiert (A). Darstellung der Topotecanakkumulation nach dreistündiger Inkubation der Zellen bei 25  $\mu$ M Topotecan in Caco-2 Zellen in Abhängigkeit von steigenden Flavon- (B) bzw. Chrysinkonzentrationen (C). Die Topotecanakkumulation wurde fluoreszenzoptisch ermittelt (Ex: 355 nm, Em: 538 nm; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 versus Kontrolle)



### 4.1.3 Expressionsanalyse der Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP in Caco-2 Zellen

Die erhöhte Topotecanakkumulation in Gegenwart von Flavon und Chrysin deutet auf ein MDR-umkehrendes Potential beider Flavonoide hin. Im Hinblick auf langfristige Effekte der Flavonoide sind allerdings auch Wirkungen auf Expressionsebene zu berücksichtigen. Um diese Effekte genauer zu betrachten, sollte der Einfluss von Flavon und Chrysin auf die Expressionsraten der ABC-Transporter nach einer längerfristigen Inkubation untersucht werden. Nach einer 48stündigen Inkubation mit 250  $\mu\text{M}$  Flavon (Abb. 4.5 (A)) oder 250  $\mu\text{M}$  Chrysin (Abb. 4.5 (B)) bzw. mit 25  $\mu\text{M}$  Topotecan (A und B) bewirkten alle drei P-gp Substrate eine deutliche Steigerung der P-gp Expression.



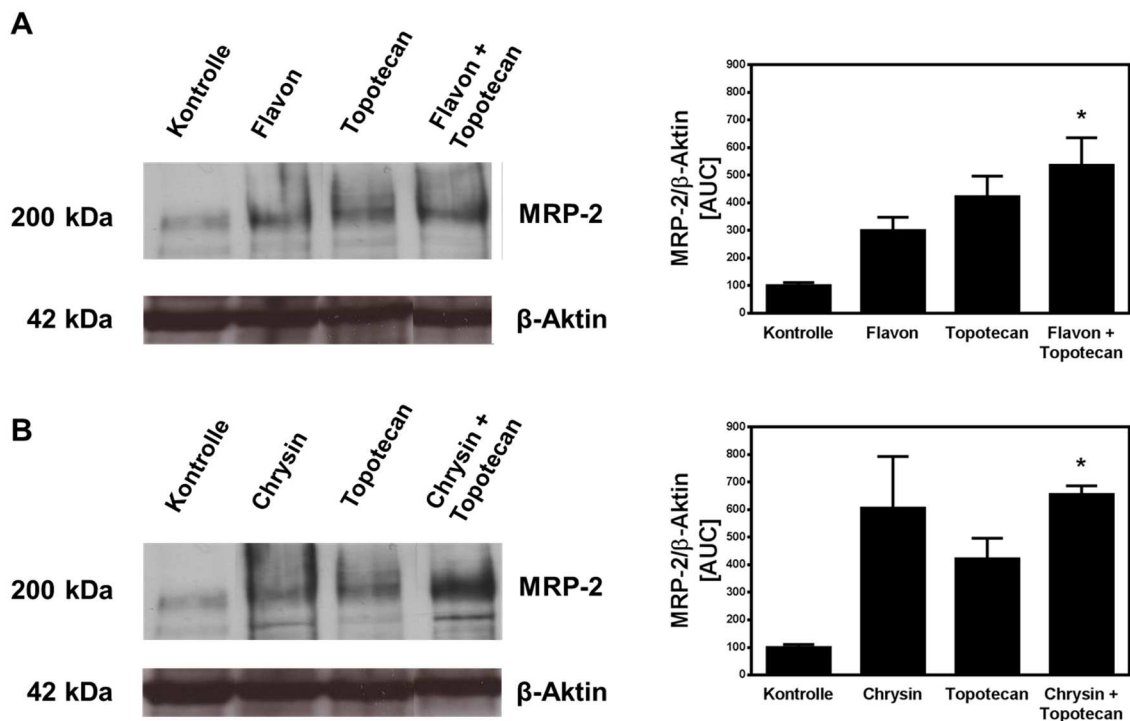
**Abb. 4.5: Expressionsanalyse von P-gp nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination**

Caco-2 Zellen wurden für 48 Stunden mit 250  $\mu\text{M}$  Flavon (**A**), 250  $\mu\text{M}$  Chrysin (**B**), 25  $\mu\text{M}$  Topotecan oder der Kombination aus Topotecan und Flavon (**A**) bzw. Chrysin (**B**) inkubiert. Die Expression wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle per Western Blot bestimmt. Jeweils 30  $\mu\text{g}$  Protein der Membranfraktion wurden pro Bedingung eingesetzt. Als Referenzprotein ist  $\beta$ -Aktin abgebildet. Die linke Spalte zeigt repräsentative Ergebnisse der Western Blot Experimente, während in der rechten Spalte die densitometrischen Auswertungen der P-gp Banden dargestellt sind.

Flavon bewirkt einen 1,7fachen Anstieg der P-gp Expression, während Chrysin einen Anstieg um den Faktor 2,5 verursachte. Topotecan erhöhte die P-gp Expression ebenfalls 1,7fach. Nach der kombinierten Inkubation mit Flavon und Topotecan ist ein 2,2facher bzw. nach der Kombination von Chrysin und Topotecan

ein 2,7facher Anstieg der Expressionsrate gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Dieser Anstieg der P-gp Expression ist somit für beide Flavonoide in Kombination mit Topotecan signifikant höher als die alleinige Topotecan-induzierte Steigerung der P-gp Expression.

Auf die Expression des ABC-Transporters MRP-2 zeigte Flavon einen deutlicheren Effekt als auf die des P-gp. Hier wird die Expression nach 48stündiger Inkubation um den Faktor 3,0 erhöht. Die kombinierte Inkubation mit Flavon und Topotecan bewirkt eine deutliche Expressionssteigerung von MRP-2 um den Faktor 5,4, verglichen mit der Kontrolle (Abb. 4.6 (A)).



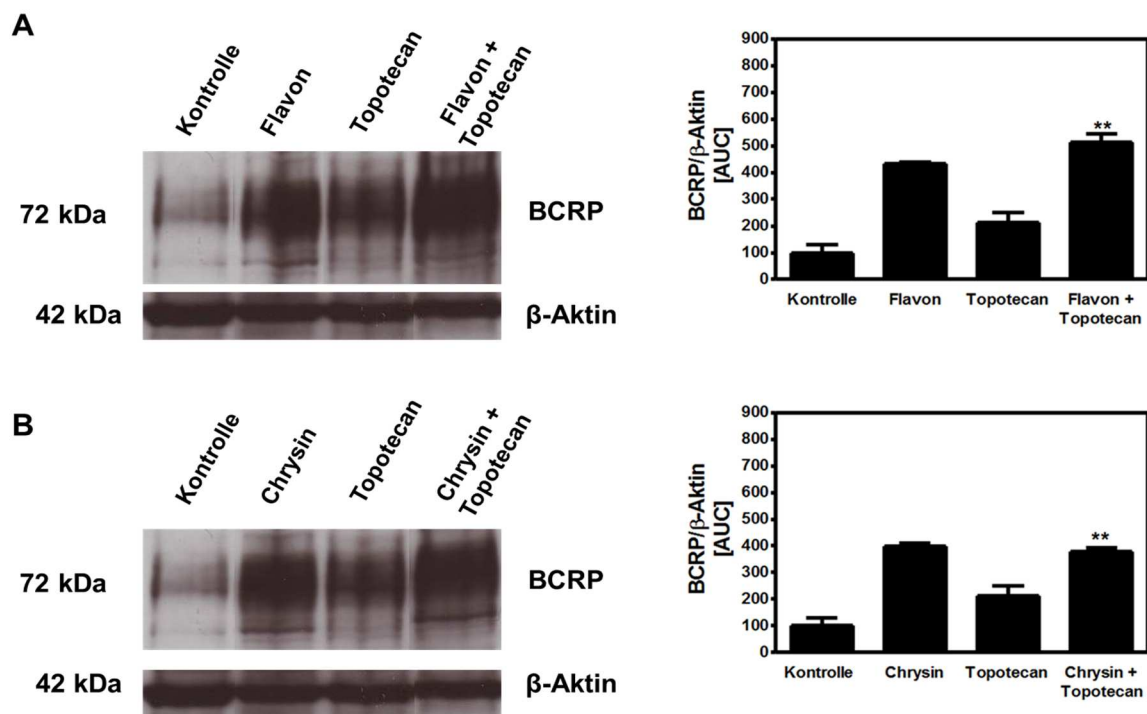
**Abb. 4.6: Expressionsanalyse von MRP-2 nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination**

Caco-2 Zellen wurden für 48 Stunden mit 250  $\mu$ M Flavon (**A**), 250  $\mu$ M Chrysin (**B**), 25  $\mu$ M Topotecan oder der Kombination aus Topotecan und Flavon (**A**) bzw. Chrysin (**B**) inkubiert. Die Expression wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle per Western Blot bestimmt. Jeweils 30  $\mu$ g Protein der Membranfraktion wurden pro Bedingung eingesetzt. Als Referenzprotein ist  $\beta$ -Aktin abgebildet. Die linke Spalte zeigt repräsentative Ergebnisse der Western Blot Experimente, während in der rechten Spalte die densitometrischen Auswertungen der MRP-2 Banden dargestellt sind.

Chrysin erhöht, ähnlich wie Flavon, die MRP-2 Expression. Allerdings fällt dieser Effekt deutlicher aus. Hier steigt die Expression im Vergleich zur Kontrolle 6,5fach an. Chrysin weist damit einen wesentlich stärkeren Einfluß auf die MRP-2 Expressionsrate auf als Flavon. Darüberhinaus verursacht Chrysin in Gegenwart

von Topotecan eine zusätzliche Steigerung der Expressionsrate um den Faktor 6,6. Ebenso wie die Kombination Flavon und Topotecan, stellt sich die Steigerung der Expressionsrate nach der kombinierten Expression von Chrysin und Topotecan sowohl gegenüber der Kontrolle wie auch der Inkubation mit Topotecan als signifikant dar. Während die alleinige Inkubation mit Topotecan lediglich einen 4,2fachen Anstieg bewirkt (Abb. 4.6 B).

Auf die Menge des Proteins BCRP zeigen die beiden Flavonoide Flavon und Chrysin einen ähnlichen Effekt wie auf die Spiegel der Transporter P-gp und MRP-2 (Abb. 4.7). Im Falle von Flavon wird die BCRP Expression 4,3fach und durch Chrysin 4,0fach erhöht. Topotecan bewirkt eine Steigerung der BCRP Expression um den Faktor 2,1. Diese gesteigerte Expressionsrate wird durch die Kombination von Topotecan mit Flavon auf den 5,6fachen bzw. durch die Kombination mit Chrysin auf den 4,8fachen Wert der Kontrolle erhöht.



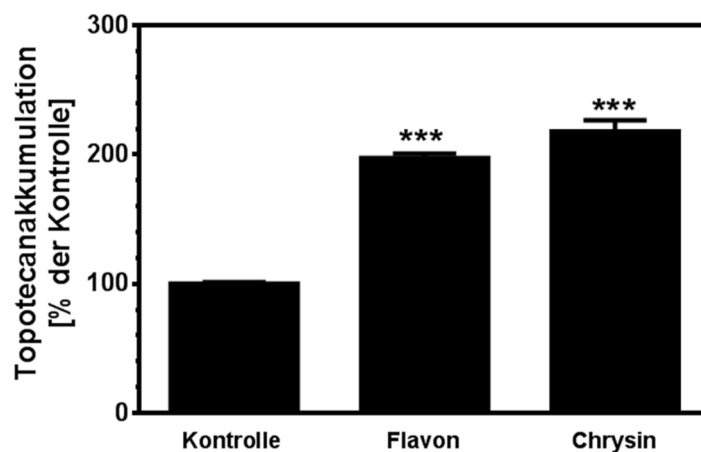
**Abb. 4.7: Expressionsanalyse von BCRP nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination**

Caco-2 Zellen wurden für 48 Stunden mit 250  $\mu$ M Flavon (**A**), 250  $\mu$ M Chrysin (**B**), 25  $\mu$ M Topotecan oder der Kombination aus Topotecan und Flavon (**A**) bzw. Chrysin (**B**) inkubiert. Die Expression wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle per Western Blot bestimmt. Jeweils 30  $\mu$ g Protein der Membranfraktion wurden pro Bedingung eingesetzt. Als Referenzprotein ist  $\beta$ -Aktin abgebildet. Die linke Spalte zeigt repräsentative Ergebnisse der Western Blot Experimente, während in der rechten Spalte die densitometrischen Auswertungen der BCRP Banden dargestellt sind.

Bezogen auf Topotecan stellt sich diese Erhöhung der Expression sowohl bei Flavon wie auch bei Chrysin als signifikant dar.

Beide Flavonoide wirken stimulierend auf die Expression der untersuchten ABC-Transporter, sowohl alleine, wie auch in Gegenwart von Topotecan (Abb. 4.5-Abb. 4.7).

Die Hemmung des Transportes durch die Flavonoide zeigt sich nach einmaliger Gabe bei einer 48stündigen Inkubation persistierend. Topotecan akkumuliert auch nach 48 Stunden trotz erhöhter Transporterexpression stärker in den Caco-2 Zellen, wenn Topotecan zusammen mit Flavon oder Chrysin zugegeben wurde. Die Akkumulation von Topotecan wird durch Flavon um den Faktor 2,0 und durch Chrysin um den Faktor 2,2 jeweils signifikant erhöht (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Erhöhte Topotecanakkumulation in Caco-2 Zellen nach 48stündiger Inkubation mit Flavon und Chrysin**

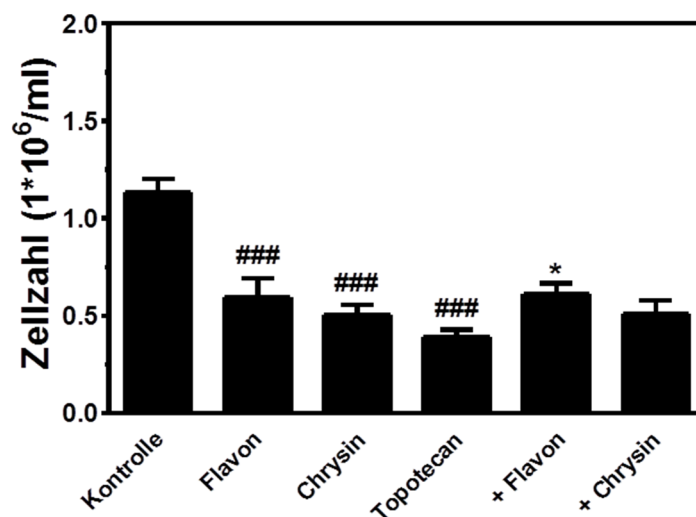
Die Zellen wurden in Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  Topotecan (Kontrolle) und zusätzlich von 250  $\mu\text{M}$  Flavon oder 250  $\mu\text{M}$  Chrysin inkubiert. Nach 48 Stunden wurde der Gehalt des fluoreszierenden Topotecans in den Zellen bei Ex: 355 nm und Em: 538 bestimmt (\*\*p<0,001 versus Kontrolle).

## 4.2 Einfluss der Flavonoide Flavon und Chrysin auf zentrale Parameter der Karzinogenese

### 4.2.1 Proliferation und Differenzierung

Zusätzlich zur Apoptose sollten als weitere zentrale Parameter der Karzinogenese Proliferation und Differenzierung der Caco-2 Zellen betrachtet werden. Durch die Bestimmung der Proliferationsrate lässt sich das Zellwachstum der Caco-2 Zellen

nach Inkubation mit den entsprechenden Effektoren näher charakterisieren. Hierzu wurden die Zellen 48 Stunden nach dem Aussähen für weitere 48 Stunden in frischem Medium, dem die Effektoren zugesetzt waren, inkubiert. Die Flavonoide Flavon und Chrysin hemmten die Proliferationsrate von Caco-2 Zellen signifikant. Im Falle einer Inkubation der Zellen mit 250  $\mu\text{M}$  Flavon sank die Proliferationsrate auf  $52,5 \pm 17,3\%$  der Kontrolle. Eine Inkubation mit 250  $\mu\text{M}$  Chrysin bewirkte einen Rückgang der Proliferationsrate auf  $44,6 \pm 8,9\%$  der Kontrolle. Das Tumortherapeutikum Topotecan hemmt die Proliferation am effektivsten. Nach einer 48stündigen Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Topotecan sind lediglich  $34,6 \pm 6,4\%$  der Zellen der Kontrolle zu verzeichnen. Die zusätzliche Applikation von 250  $\mu\text{M}$  Flavon zu 25  $\mu\text{M}$  Topotecan erhöhte die Topotecan-reduzierte Proliferationsrate wieder auf  $53,7 \pm 9,8\%$  der Kontrolle und zeigt sich somit signifikant. Die Kombination von 250  $\mu\text{M}$  Chrysin mit 25  $\mu\text{M}$  Topotecan bewirkt, daß die durch Topotecan reduzierte Proliferationsrate wieder auf  $45,0 \pm 11,8\%$  ansteigt. Eine Koinkubation beider Flavonoide mit Topotecan bewirkt somit eine Steigerung der Zellproliferation gegenüber der alleinigen Topotecaninkubation, was durch die beschriebene Hemmung der Apoptose erklärbar wäre (Abb. 4.9).

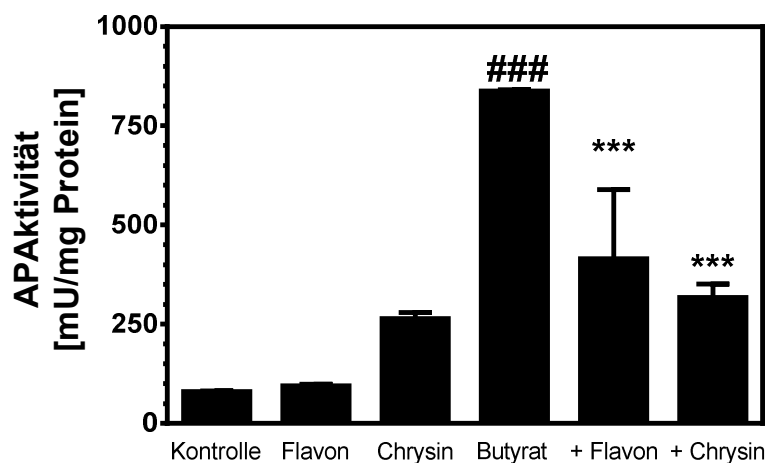


**Abb. 4.9: Darstellung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen**

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Zellen 48 Stunden mit 250  $\mu\text{M}$  Flavon, 250  $\mu\text{M}$  Chrysin, 25  $\mu\text{M}$  Topotecan oder der Kombination von Topotecan mit Flavon oder Chrysin inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (### $p < 0,001$  versus Kontrolle, \* $p < 0,05$  versus Topotecan).

Neben einem Effekt der Flavonoide Flavon und Chrysin auf die Proliferationsrate sollte ebenfalls ein möglicher Effekt auf den Differenzierungsgrad gezeigt werden.

Als Marker für den Differenzierungsgrad der Caco-2 Zellen wurde die alkalische Phosphatase (AP) verwendet, da diese im Laufe der Differenzierung stärker exprimiert wird. Butyrat ist ein potent die Differenzierung steigerndes Agens und vermittelte eine Steigerung der AP-Aktivität von  $80,4 \pm 5,5$  mU/mg Protein bei Kontrollzellen auf  $837,6 \pm 4,2$  mU/mg Protein (Abb. 4.10). Die alleinige Applikation von Flavon bewirkt lediglich eine geringe Veränderung des Differenzierungsgrades der Caco-2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle ( $95,5 \pm 11,3$  mU/mg Protein). Durch Kombination von Flavon und Butyrat wird die Butyrat-induzierte Förderung der Differenzierung signifikant reduziert ( $415,5 \pm 245,7$  mU/mg Protein). Die Inkubation mit 250  $\mu$ M Chrysin hingegen erhöht die Aktivität der AP auf  $264,7 \pm 20,4$  mU/mg Protein gegenüber der Kontrolle. Trotz dieser Förderung der AP-Aktivität zeigt auch Chrysin einen signifikanten Rückgang der durch Butyrat-induzierten Differenzierung der Caco-2 Zellen.

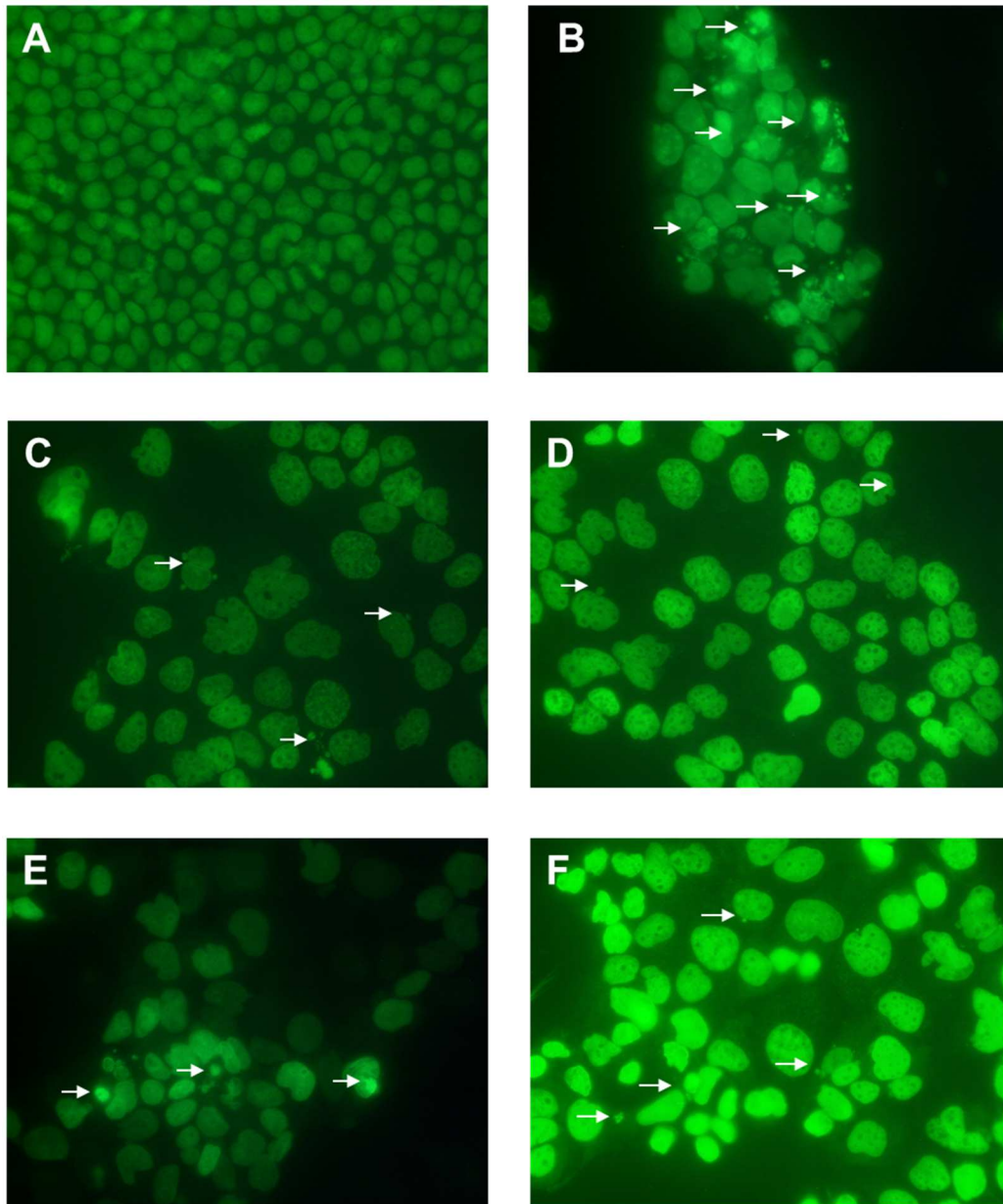


**Abb. 4.10: Darstellung des Differenzierungsgrades von Caco-2 Zellen**

Nachweis der Aktivität der AP. Die Zellen wurden 48 Stunden mit 250  $\mu$ M Flavon, 250  $\mu$ M Chrysin, 5 mM Butyrat oder der Kombination von Butyrat mit Flavon oder Chrysin inkubiert (### $p < 0,001$  versus Kontrolle, \*\*\* $p < 0,001$  versus Butyrat).

#### 4.2.2 Flavon und Chrysin inhibieren potent die Topotecan-induzierte Apoptose

Trotz der erhöhten intrazellulären Topotecankonzentration unter Flavon- bzw. Chrysinexposition zeigen die Caco-2 Zellen eine Reduktion der Apoptose (Abb. 4.11).

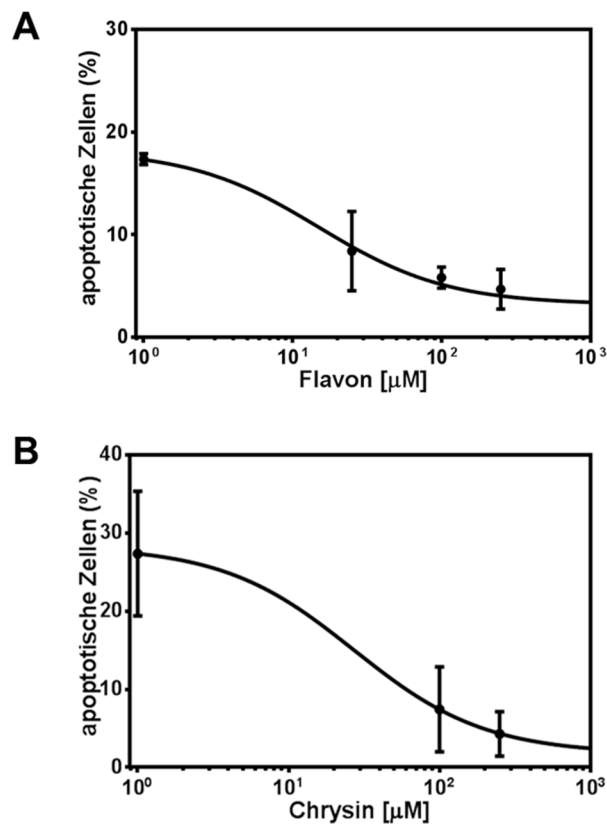


**Abb. 4.11: Nachweis der Topotecan-induzierten Apoptose in Caco-2 Zellen mittels Zellkernfärbung**

Nach 48stündiger Inkubation wurden die Zellkerne der Caco-2 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sytox Green (0,05 µM) gefärbt und bei Ex: 470 nm und Em: 520 nm fotografiert. Die weißen Pfeile markieren die Chromatinabschnürungen als Zeichen apoptotischer Ereignisse in der späten Phase des Prozesses. **(A)** Kontrolle, **(B)** 25 µM Topotecan, **(C)** 250 µM Flavon, **(D)** 250 µM Chrysin, **(E)** 250 µM Flavon + 25 µM Topotecan, **(F)** 250 µM Chrysin + 25 µM Topotecan

Das Zytostatikum Topotecan-induziert in Caco-2 Zellen bei einer Konzentration von 25 µM sehr effektiv Apoptose ( $17,4 \pm 0,5\%$  apoptotische Zellen), während Flavon ( $1,8 \pm 1,3\%$ ) und Chrysin ( $1,8 \pm 0,6\%$ ) in Konzentrationen von 250 µM keinerlei Effekte auf die DNA-Fragmentierung als Apoptoseparameter zeigen (Abb. 4.12). Die Apoptoserate nach Topotecaninkubation wird durch die zusätzliche Applikation Flavon bzw. Chrysin konzentrationsabhängig reduziert. So bewirkt die zusätzliche

Gabe von Flavon einen  $EC_{50}$ -Wert von 15  $\mu M$  und die von Chrysin einen  $EC_{50}$ -Wert von 27  $\mu M$ . Somit zeigen beide Flavonoide eine effektive Reduktion der Apoptose.



**Abb. 4.12: Dosisabhängige Reduktion der Topotecan-vermittelten Apoptose durch Flavon und Chrysin**

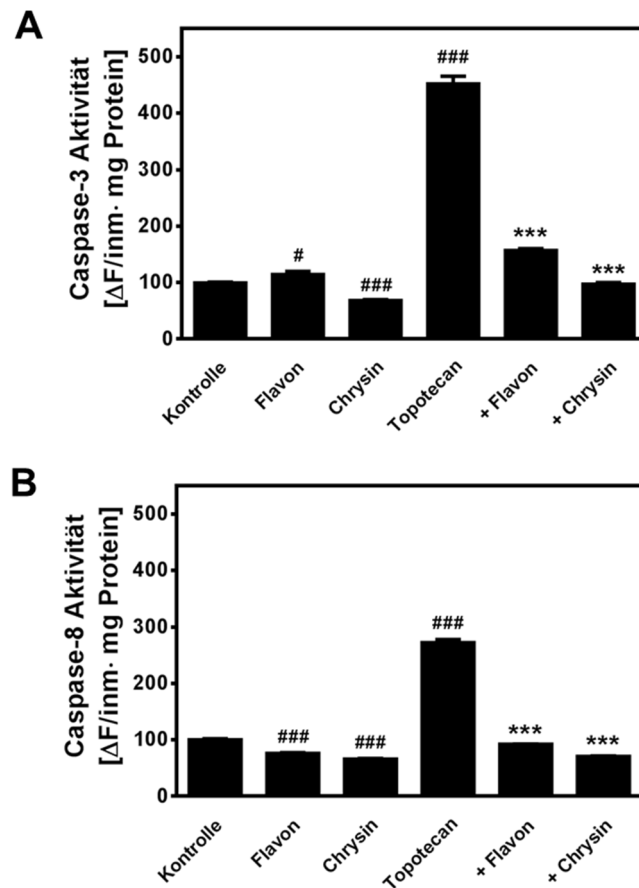
Nach 48stündiger Inkubation mit 25  $\mu M$  Topotecan und steigenden Flavon- (**A**) und Chrysinkonzentrationen (**B**) wurden die Zellkerne der Caco-2 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sytox Green (0,05  $\mu M$ ) gefärbt und bei Ex: 470 nm und Em: 520 nm fotografiert. Der prozentuale Anteil an Zellen mit Chromatinabschnürungen als Zeichen apoptotischer Ereignisse in der späten Phase des Prozesses wurde durch Auszählen bestimmt.

#### 4.2.3 Flavon und Chrysin inhibieren die Topotecan-vermittelte Aktivierung der Caspase-3 und der Caspase-8

Eine Aktivierung der Caspase-3 durch die Caspase-8 stellt eine Möglichkeit dar, den programmierten Zelltod einzuleiten. Die Aktivitäten beider Caspasen können hier als Indikator einer frühen Phase der Apoptose dienen. Eine Inkubation der Caco-2 Zellen über 48 Stunden mit 25  $\mu M$  Topotecan bewirkte einen signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivität auf den 4,5fachen Wert der Kontrollzellen (Abb. 4.13). Während eine Applikation von 250  $\mu M$  Flavon zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle führt und somit keinen Effekt auf die Caspase-3-Aktivität zeigt (1,1fache Steigerung), reduziert eine Inkubation mit



250  $\mu$ M Chrysin diese signifikant um 31%. Eine kombinierte Inkubation von 25  $\mu$ M Topotecan mit 250  $\mu$ M Flavon führt zu einer signifikanten Reduktion der Topotecan-induzierten Caspase-3-Aktivität auf den 1,6fachen Wert der Kontrolle. Eine Kombination mit 250  $\mu$ M Chrysin reduziert die Topotecan-induzierte Caspase-3-Aktivität ebenfalls signifikant auf 98% der Kontrolle



**Abb. 4.13: Aktivität der Caspasen-3 und -8 nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination**

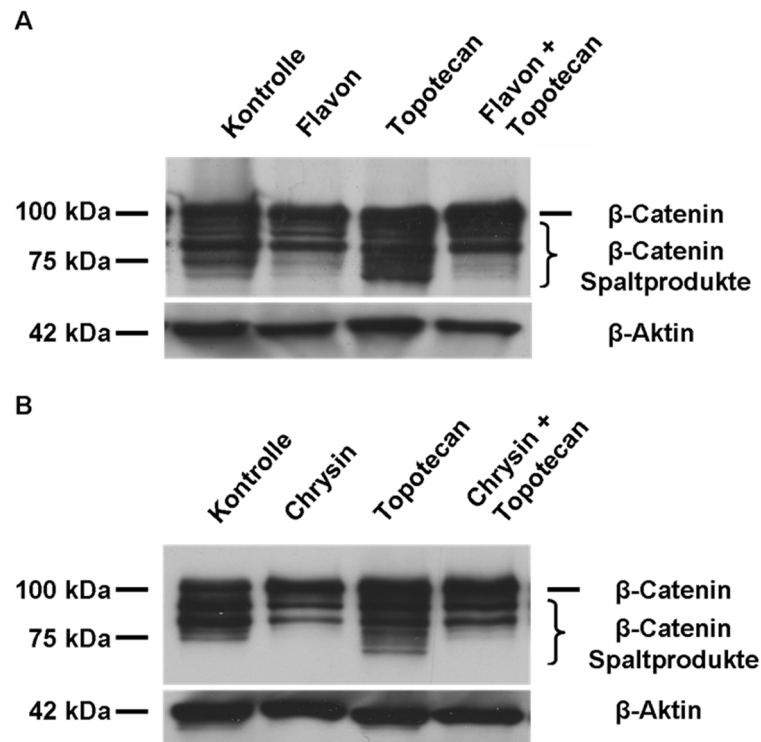
Darstellung der Aktivität der Effektorcaspase-3 (**A**) und der Initiatorcaspase-8 (**B**) nachdem die Caco-2 Zellen für jeweils 48 Stunden mit 250  $\mu$ M Flavon, 250  $\mu$ M Chrysin, 25  $\mu$ M Topotecan oder deren Kombination inkubiert wurden (\* $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  versus Kontrolle, \*\*\* $p < 0,001$  versus Topotecan).

Im Falle der Caspase-8-Aktivität zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Eine Exposition der Caco-2 Zellen gegenüber 25  $\mu$ M Topotecan verursacht einen 2,7fachen Aktivitätsanstieg der Caspase-8. Flavon verursacht in einer Konzentration von 250  $\mu$ M eine signifikante Reduktion der Caspase-8-Aktivität um 24%. Chrysin reduziert die Caspase-8-Aktivität unter den gewählten Bedingungen um 34% gleichermaßen signifikant. Eine zusätzliche Applikation von 250  $\mu$ M der Flavonoide zu 25  $\mu$ M Topotecan vermindert die Topotecan-induzierte Caspase-8-Aktivität im Falle von Flavon signifikant auf 92% der Kontrolle und im Fall von Chrysin wird diese auf 71% reduziert.

### **4.3 Stabilisierung des zytosolischen $\beta$ -Catenin durch Flavon und Chrysin**

#### **4.3.1 Flavon und Chrysin inhibieren die Topotecan-induzierte $\beta$ -Catenin Spaltung**

Da die Caspase-3 und die Caspase-8 an der Degradation von  $\beta$ -Catenin beteiligt sind, sollte überprüft werden, inwieweit diese Degradation durch Flavon und Chrysin moduliert wird. Hier wurde der Einfluss der Effektoren auf die Integrität des zytosolischen  $\beta$ -Catenin untersucht und die  $\beta$ -Catenin Spaltprodukte bestimmt. Flavon bewirkt eine deutlich geringere Spaltung von  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur Kontrolle. Während 25  $\mu$ M Topotecan eine Erhöhung der intrazellulären  $\beta$ -Catenin Spaltprodukte verursachte, wurde diese Topotecan-induzierte Spaltung durch 250  $\mu$ M Flavon drastisch reduziert. Nach Inkubation mit 250  $\mu$ M Chrysin zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Spaltung durch 25  $\mu$ M Topotecan wird durch Chrysin deutlich inhibiert. Beide Flavonoide sind somit in der Lage  $\beta$ -Catenin im Zytosol zu stabilisieren, indem sie dessen Abbau unterbinden (Abb. 4.14).

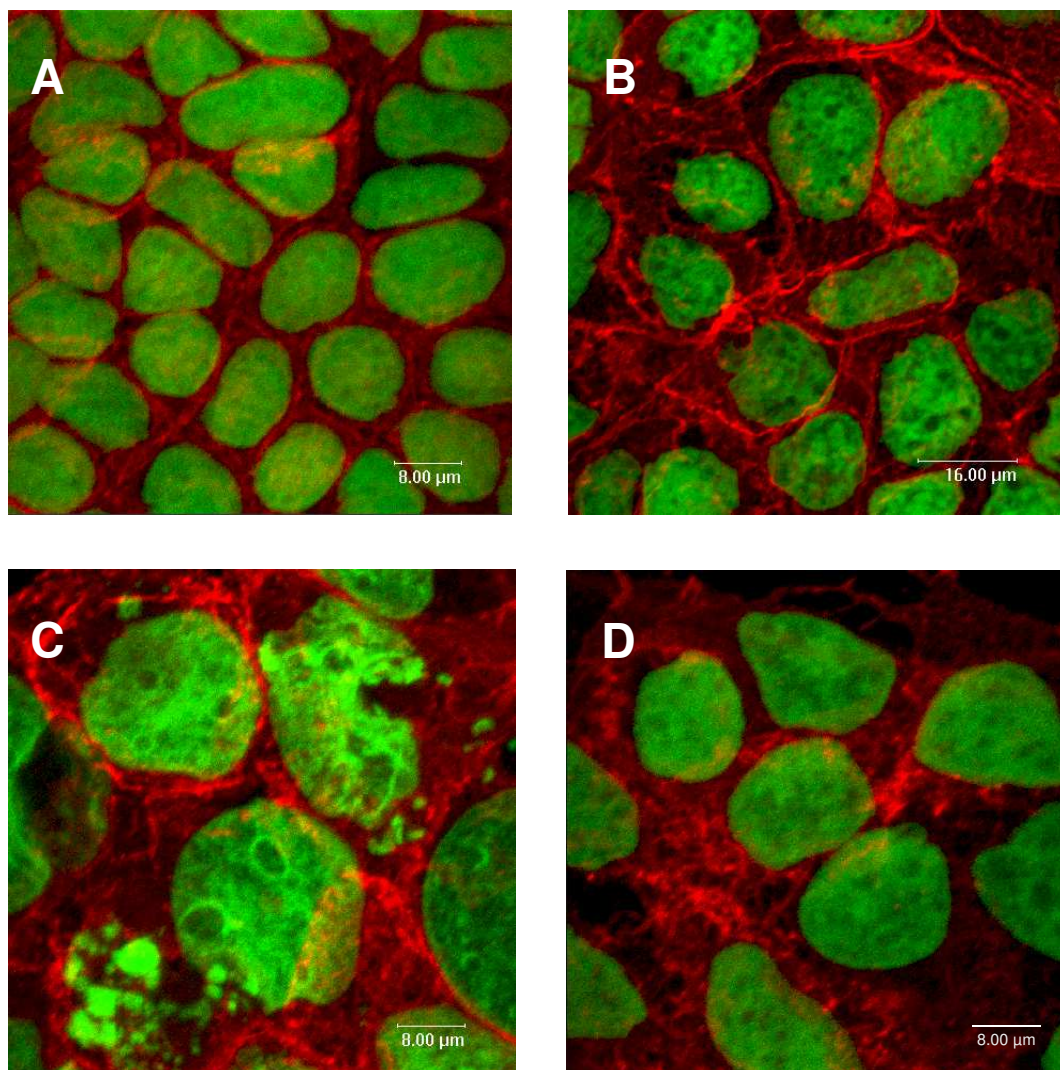


**Abb. 4.14: Detektion von  $\beta$ -Catenin Spaltprodukten nach Inkubation mit Flavon, Chrysin, Topotecan und deren Kombination**

Caco-2 Zellen wurden für 48 Stunden mit den jeweiligen Effektoren inkubiert und die  $\beta$ -Catenin Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle per Western Blot bestimmt. Jeweils 30  $\mu$ g Protein der zytosolischen Proteinfraction wurden pro Bedingung eingesetzt. Als Referenzprotein wurde  $\beta$ -Aktin detektiert. Inkubation mit 250  $\mu$ M Flavon, 25  $\mu$ M Topotecan oder einem Gemisch aus beiden (**A**) Inkubation mit 250  $\mu$ M Chrysin, 25  $\mu$ M Topotecan oder deren Kombination (**B**)

### 4.3.2 Flavon und Chrysin fördern die zytosolische $\beta$ -Catenin Anreicherung

Der immunhistochemische  $\beta$ -Catenin Nachweis in Caco-2 Zellen (Abb. 4.15) zeigt eine deutliche Fokussierung in der Zellmembran unbehandelter Zellen. Eine Inkubation mit 250  $\mu$ M Flavon zeigt gegenüber der Kontrolle eine Translokation von der Zellmembran in das Zytosol. Die Inkubation mit 25  $\mu$ M Topotecan bewirkt eine ähnliche zytosolische Translokation wie durch 250  $\mu$ M Flavon. Die Kombination beider Effektoren bewirkt ebenso wie die alleinige Applikation von Flavon und Topotecan eine vermehrte  $\beta$ -Catenin Anreicherung im Zytosol und damit eine verminderte  $\beta$ -Catenin Menge in der Zellmembran.

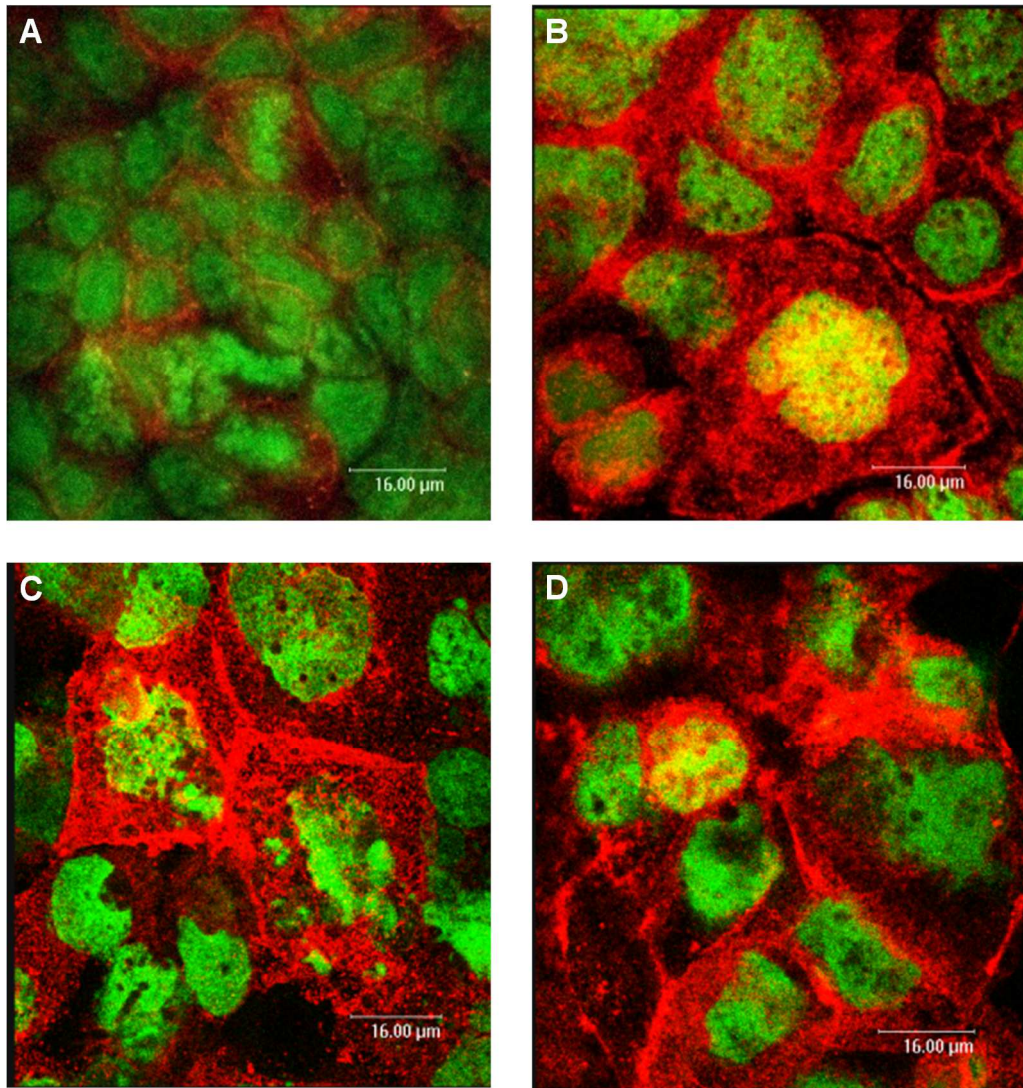


**Abb. 4.15: Immunhistochemischer Nachweis der  $\beta$ -Catenin Lokalisation in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Flavon, Topotecan und deren Kombination**

Repräsentative Bilder des immunhistochemischen  $\beta$ -Catenin Nachweises in Caco-2 Zellen nach 48stündiger Inkubation mit den jeweiligen Effektoren: Kontrolle (**A**), 250  $\mu$ M Flavon (**B**), 25  $\mu$ M Topotecan (**C**), 250  $\mu$ M Flavon + 25  $\mu$ M Topotecan (**D**).

Fluoreszenzfarbstoffe:  $\beta$ -Catenin: Streptavidin-Cy5 (rot), Zellkerne: Sytox Green (grün)  
Antikörper: mouse-anti- $\beta$ -Catenin

Die Inkubation der Caco-2 Zellen mit 250  $\mu$ M Chrysin bewirkt ebenso wie die Inkubation mit Flavon eine Translokation des  $\beta$ -Catenin von der Zellmembran in das Zytoplasma. Dieses Lokalisationsmuster zeigt sich ebenfalls unter Koapplikation von Chrysin und Topotecan (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16: Immunhistochemischer Nachweis der  $\beta$ -Catenin Lokalisation in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Chrysin, Topotecan und deren Kombination**

Repräsentative Bilder des immunhistochemischen  $\beta$ -Catenin Nachweises in Caco-2 Zellen nach 48stündiger Inkubation mit den jeweiligen Effektoren: Kontrolle (A), 250  $\mu$ M Chrysin (B), 25  $\mu$ M Topotecan (C), 250  $\mu$ M Chrysin + 25  $\mu$ M Topotecan (D).

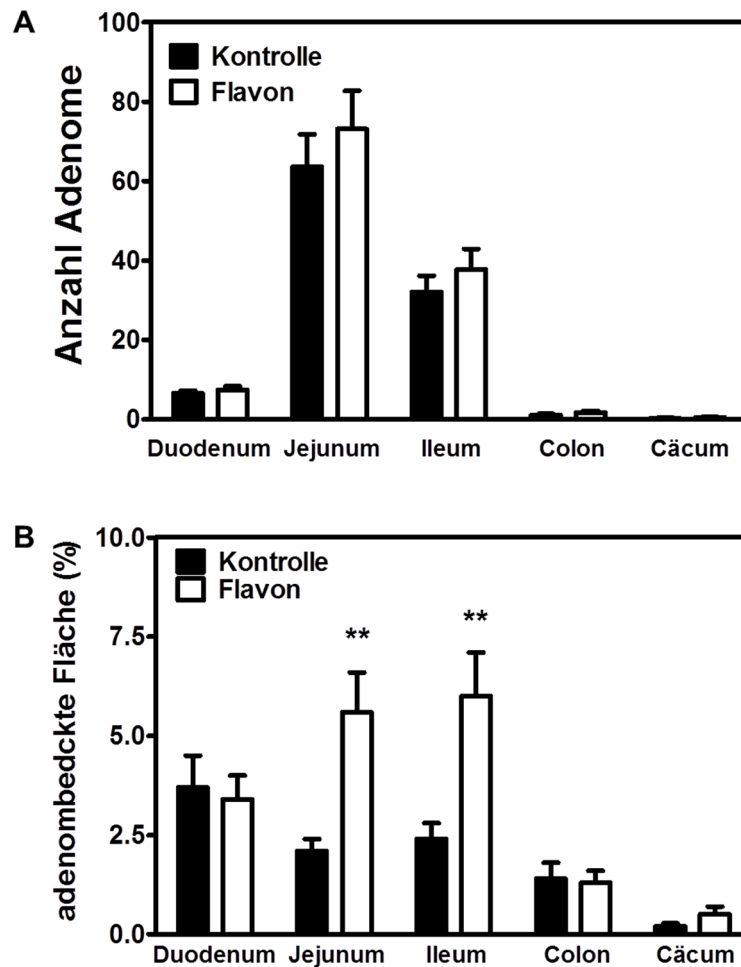
Fluoreszenzfarbstoffe:  $\beta$ -Catenin: Streptavidin-Cy5 (rot), Zellkerne: Sytox Green (grün)  
Antikörper: mouse-anti- $\beta$ -Catenin



#### 4.4 Flavon erhöht die Anzahl an Adenomen im Dünndarm von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen

In HT-29 Zellen, einer CRK-Zelllinie, konnte nach Applikation von Flavon eine potente Apoptose-Induktion nachgewiesen werden [103]. Durch Studien an C57BL/6J Mäusen wurde gezeigt, dass Flavon die Anzahl chemisch induzierter aberranter Krypten im Darm dieser Mäuse potent reduzieren kann [11]. Da es sich bei aberranten Krypten allerdings nur um gutartige Vorstufen von Karzinomen handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell gewählt, bei dem es zur Ausbildung intestinaler Neoplasien kommt.

In APC<sup>min/+</sup>-Mäusen, welche über einen Zeitraum von vier Wochen, jeweils an fünf aufeinander folgenden Tagen pro Woche, mit 400 mg Flavon pro kg Körpergewicht schlundiert wurden, fanden sich deutlich mehr Adenome, als in Tieren, die ein Vehikel erhielten. Im Jejunum, wie auch im Ileum stieg neben der Anzahl der Adenome auch die mit Adenomen bedeckte Fläche. So finden sich vor der Flavonbehandlung im Jejunum  $63,6 \pm 8,2$  Adenome und am Ende des Versuchszeitraums  $73,2 \pm 9,6$ . Dieser Effekt fällt im Ileum nicht so deutlich aus, hier steigt die Anzahl der Adenome von  $32,1 \pm 4,0$  auf  $37,7 \pm 5,2$ . Im Colon erhöht sich die Anzahl der Adenome ebenfalls von  $1,1 \pm 0,3$  auf  $1,8 \pm 0,4$ . Sowohl im Duodenum, wie auch im Cäcum bleibt die Anzahl der Adenome mit  $6,6 \pm 0,7$  (Duodenum) bzw.  $0,3 \pm 0,1$  (Cäcum) vor der Flavongabe und  $7,5 \pm 0,9$  bzw.  $0,5 \pm 0,2$  im Anschluss an die Applikation in etwa gleich (Abb. 4.17 (A)). Im Duodenum zeigt sich hinsichtlich der adenombedeckten Fläche kein Effekt durch Flavon. Vor der Behandlung liegt diese Fläche bei  $4,1 \pm 0,8\%$  und danach bei  $4,0 \pm 0,8\%$ . Demgegenüber steht ein deutlicher Effekt im Dünndarm, der im Jejunum und im Ileum signifikant ist. Die Flavonbehandlung führt im Jejunum zu einem Anstieg der adenombedeckten Fläche von  $3,3 \pm 0,4\%$  auf  $7,2 \pm 1,3\%$  und im Ileum erhöht sich diese von  $4,3 \pm 0,6\%$  auf  $7,9 \pm 1,2\%$ . Im Colon zeigt sich hier ein leichter Anstieg von  $1,4 \pm 0,5\%$  auf  $1,5 \pm 0,6\%$ , welcher auch im Cäcum zu verzeichnen ist. Dort erhöht sich die adenombedeckte Fläche von  $0,2 \pm 0,1\%$  auf  $0,5 \pm 0,2\%$  (Abb. 4.17 (B)).



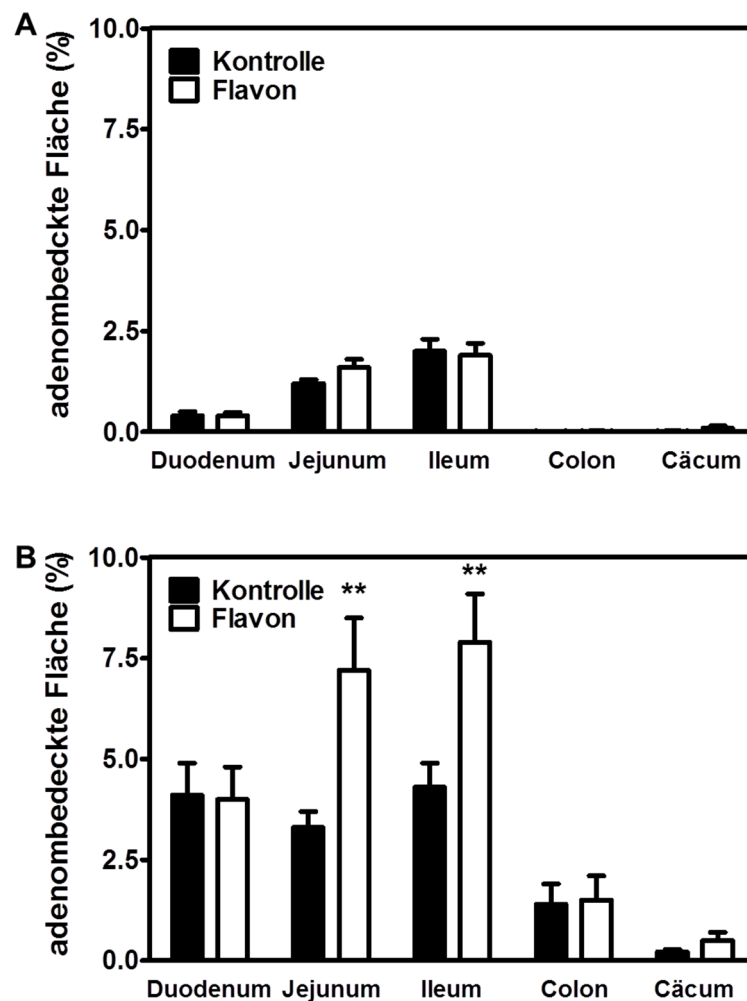
**Abb. 4.17: Flavon erhöht die Anzahl der Adenome im Dün- und Dickdarm der APC<sup>min/+</sup>-Maus**

Nach Färbung mit Methylenblau wurde mikroskopisch die Anzahl der Adenome (A) und die mit Adenomen bedeckte Fläche (B) bestimmt (\*\*p<0,01 versus Kontrolle).

## 4.5 APC<sup>min/+</sup>-Mäuse entwickeln vermehrt große Adenome nach Flavonbehandlung

Nach der Verabreichung von Flavon lassen sich deutliche Unterschiede in der Größe der Adenome erkennen. Adenome mit einer Fläche  $\geq 1 \text{ mm}^2$  wurden als große Adenome identifiziert. Die Fläche, die mit kleinen Adenomen besiedelt ist, zeigt nahezu keinen Unterschied bei Tieren, welche das Vehikel erhielten und solchen, die mit Flavon behandelt wurden. Bemerkenswert scheint hier, dass in beiden Gruppen fast keine kleinen Adenome in Colon und Cäcum gefunden wurden (Abb. 4.18 (A)). Die Gesamtfläche der einzelnen Segmente des Dün- und Dickdarms, welche mit großen Adenomen besiedelt ist, weist nach der Flavongabe einen deutlichen Anstieg auf. Dieser Anstieg ist im Ileum und im Jejunum signifikant,

während sich hier bei beiden Gruppen in Duodenum, Colon und Cäcum keine großen Unterschiede finden (Abb. 4.18 (B)). Auffällig ist allerdings, dass es sich bei den im Colon und Cäcum vorgefundenen Adenomen, sowohl bei den Kontrolltieren wie auch bei den flavonbehandelten Tieren, fast ausschließlich um große Adenome handelt. Auch im Duodenum ist die mit großen Adenomen bedeckte Fläche deutlich größer als die Fläche, welche von kleinen Adenomen bedeckt ist (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18: Größenveränderung der Adenome nach Flavonbehandlung**

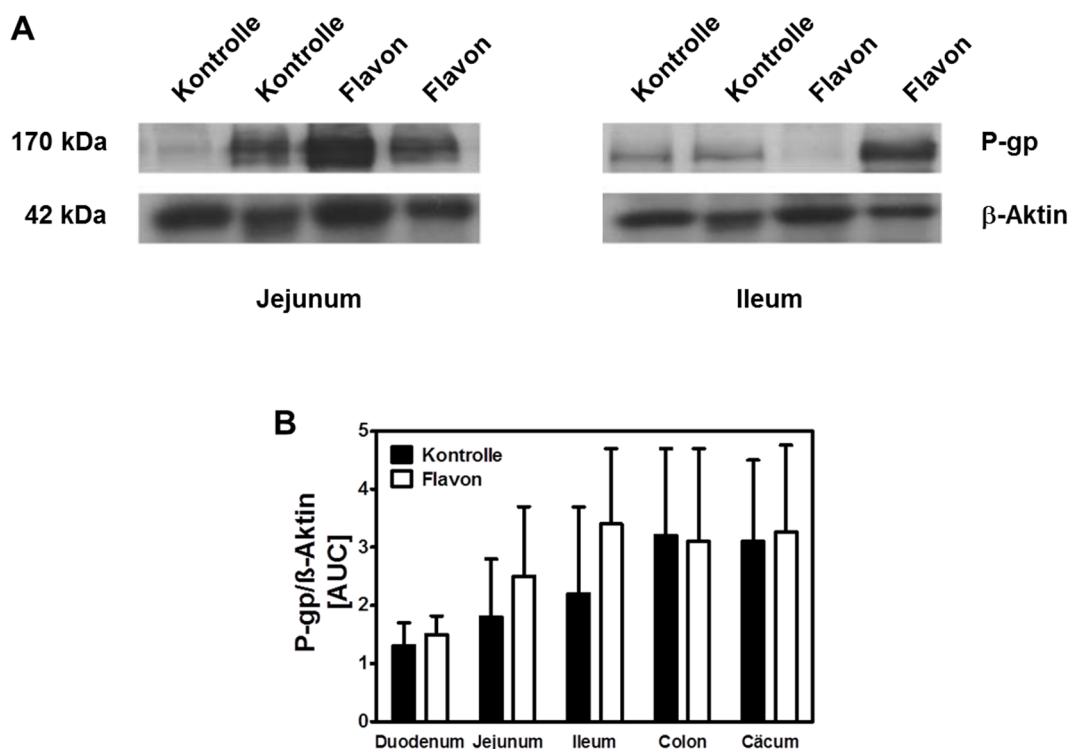
Nach Färbung mit Methylenblau wurde mikroskopisch die mit Adenomen bedeckte Fläche bestimmt und zwischen kleinen Adenomen, deren Durchmesser < 1 mm<sup>2</sup> beträgt (**A**) und großen Adenomen mit Durchmessern ≥ 1 mm<sup>2</sup> (**B**) unterschieden (\*\*p < 0,01 versus Kontrolle).



## 4.6 Nachweis der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP im Intestinaltrakt von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen

### 4.6.1 P-gp Nachweis im Intestinum der APC<sup>min/+</sup>-Maus

Um zu zeigen, ob die in Caco-2 Zellen gefundene Assoziation zwischen P-gp Expression und Apoptosehemmung möglicherweise auch *in vivo* existiert, wurde zunächst die Expression des P-gp bestimmt. Während in Caco-2 Zellen eine Flavon Exposition zu einem Anstieg der P-gp Expression führt, zeigt sich in der APC<sup>min/+</sup>-Maus ein heterogenes Bild (Abb. 4.19).



**Abb. 4.19: Exprimierte P-gp Menge im Intestinaltrakt der APC<sup>min/+</sup>-Maus**

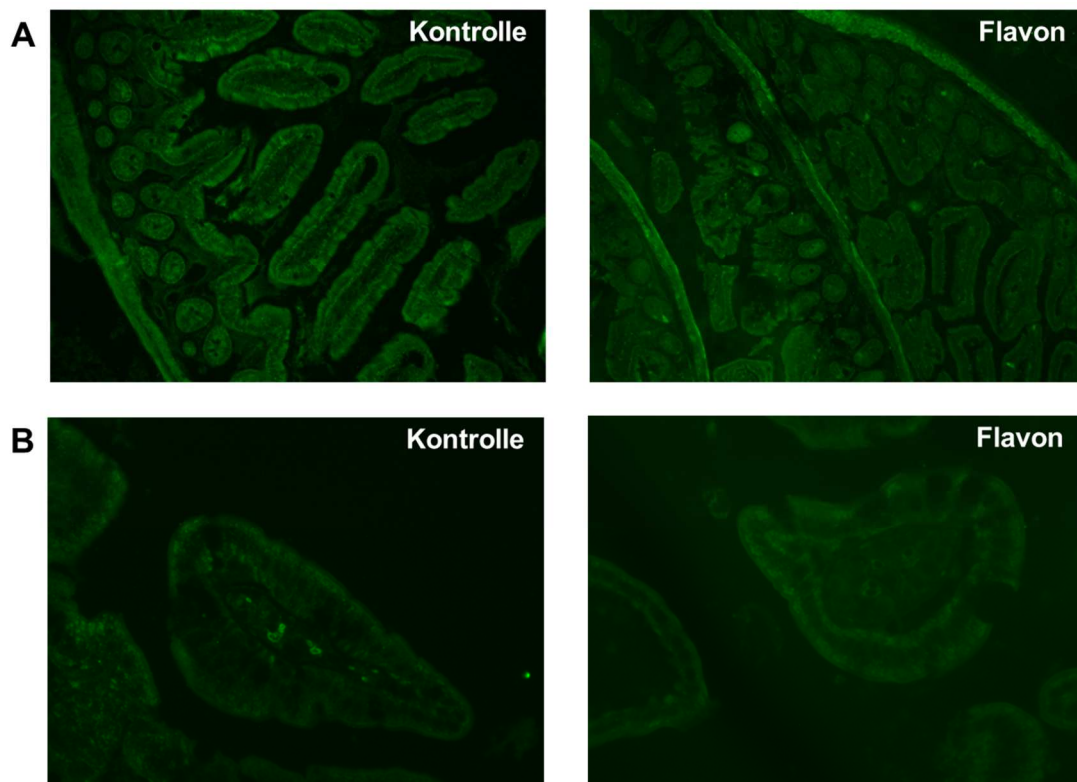
Dargestellung der P-gp Expression des Jejunums und des Ileums weiblicher APC<sup>min/+</sup>-Mäuse mittels Western Blot Experimenten. Als Referenzprotein ist β-Aktin gezeigt (**A**). Densitometrische Auswertung der P-gp Banden, die aus den Western Blot Experimenten des GIT resultierten. Die P-gp Signalintensität ist auf β-Aktin als Referenzprotein bezogen (**B**).

In allen Abschnitten des GIT zeigten die Tiere, welche über eine Sonde Flavon erhalten haben, große individuelle Schwankungen in der P-gp Expression. Die P-gp Expression reicht bei Flavon behandelten Tieren von kaum nachweisbar bis zu einem deutlichen Signal. Die große Heterogenität der Expression findet sich auch bei Geschwistertieren. Die abgebildeten Western Blots zeigen als Referenzprotein

$\beta$ -Aktin. Die densitometrische Auswertung der Western Blots zeigt für das Jejunum und das Ileum eine erhöhte Expression, welche bedingt durch die Schwankungen in beiden Fällen nicht signifikant sind. Im Duodenum ist ebenfalls eine leicht erhöhte P-gp Expression zu verzeichnen. Während sich im Colon ein leichter Rückgang zeigt, ist die P-gp Expression im Cäcum leicht erhöht. In diesen Abschnitten des GIT sind ebenfalls starke individuelle Schwankungen zu verzeichnen, die kein Signifikanzniveau erreichen.

#### 4.6.2 Immunhistochemischer Nachweis von MRP-2

Neben P-gp als Bestandteil der apikalen Membran von Enterozyten sind auch die Lokalisation und die Menge der APC-Transporter MRP-2 und BCRP in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von  $APC^{min/+}$ -Mäusen nachgewiesen worden. Der immunhistochemische MRP-2 Nachweis ist in der apikalen Membran erfolgt (Abb. 4.20).



**Abb. 4.20: Immunhistochemischer MRP-2 Nachweis in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von  $APC^{min/+}$ -Mäusen**

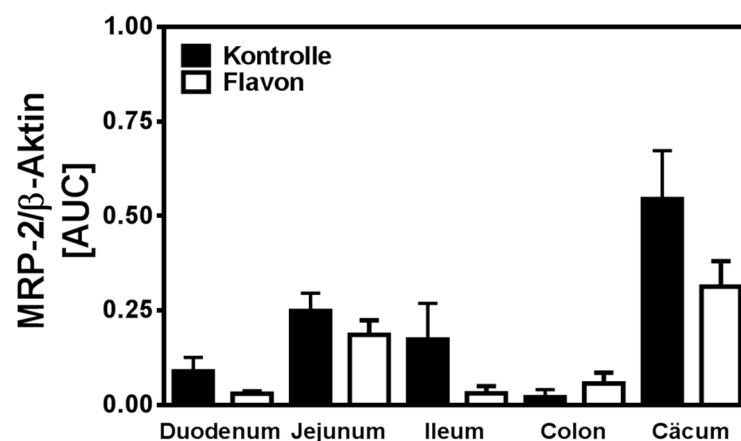
Dargestellt sind Schnitte des Jejunums (**A**) und des Ileums (**B**) von  $APC^{min/+}$ -Mäusen, welche das Vehikel erhalten haben (Kontrolle, linke Spalte) und von Flavon behandelten Tieren (rechte Spalte).

Antikörper: rabbit-polyclonal IgG

Fluoreszenzfarbstoff: Alexa-Fluor 488

Sowohl bei den Kontrolltieren wie auch bei den Tieren der Flavongruppe, zeigen sich weitgehend ähnliche Proteinspiegel. In Abb. 4.20 sind exemplarische Schnitte des Jejunums und des Ileums abgebildet, da sich in diesen Abschnitten des GIT die meisten großen Adenome nachweisen ließen. Lediglich im Ileum lässt sich ein leichter Rückgang der Fluoreszenzintensität und der damit verbundenen Menge exprimierten MRP-2 feststellen.

Die densitometrische Auswertung der MRP-2 Expression (Abb. 4.21) zeigt im Duodenum und im Jejunum ein ähnliches Expressionsmuster. Hier kommt es zu einem leichten Rückgang der MRP-2 Expression nach Flavonbehandlung. Dieser Rückgang wird im Ileum bereits deutlicher. Im Colon zeigt sich eine insgesamt geringe MRP-2 Expression, welche nach der Flavon Behandlung leicht erhöht ist. Die höchsten MRP-2 Expressionsraten konnten im Cäcum nachgewiesen werden. Hier fällt die Reduktion der MRP-2 Expression am deutlichsten aus.

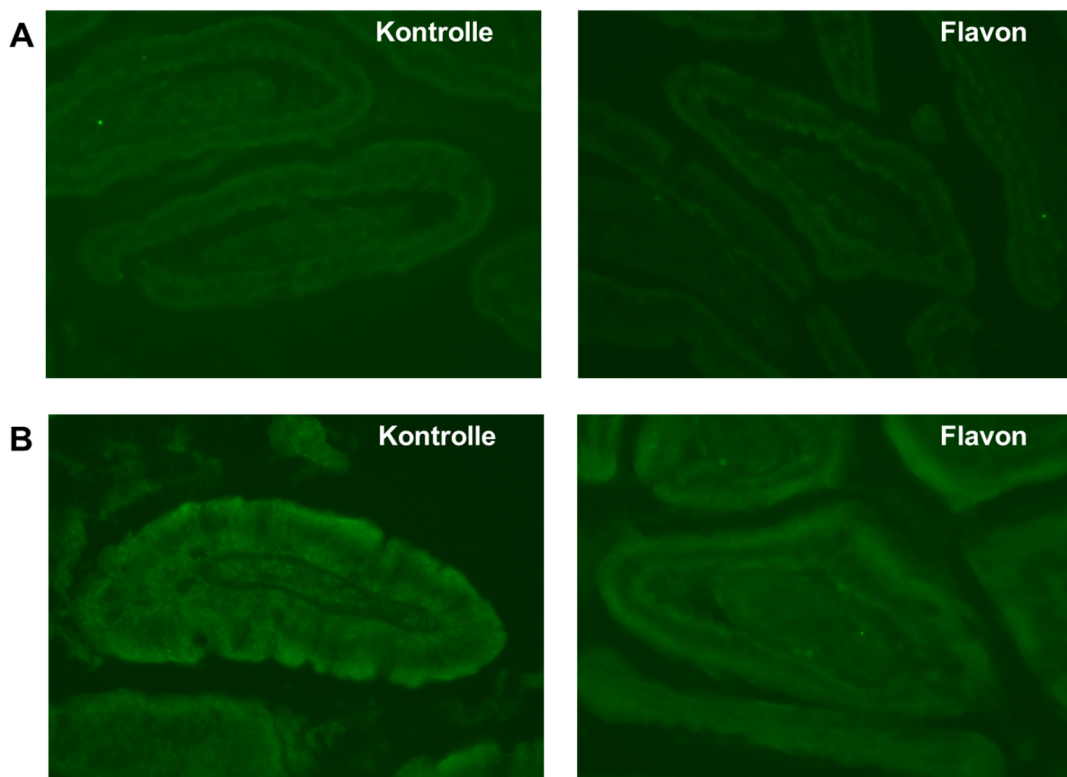


**Abb. 4.21: Exprimierte MRP-2 Menge im Intestinaltrakt der APC<sup>min/+</sup>-Maus**

Densitometrische Auswertung des Fluoreszenzsignals von jeweils sechs repräsentativen Bereichen immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte. Die P-gp Signalintensität ist auf  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein bezogen.

### 4.6.3 Immunhistochemischer Nachweis von BCRP

Als dritter untersuchter ABC-Transporter wurde auch für BCRP die Lokalisation in der apikalen Enterozytenmembran in Gewebeschnitten der APC<sup>min/+</sup>-Maus nachgewiesen und die Menge des Proteins immunhistochemisch dargestellt. Im Jejunum, wie auch im Ileum zeigt sich in den Gewebeschnitten der Versuchstiere, welche mit Flavon behandelt wurden eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzintensität. Während dieser Unterschied im Jejunum zwar deutlich ist, kommt es im Ileum zu einer noch stärkeren Reduktion des BCRP Signals (Abb. 4.22).



**Abb. 4.22: Immunhistochemischer BCRP Nachweis in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen**

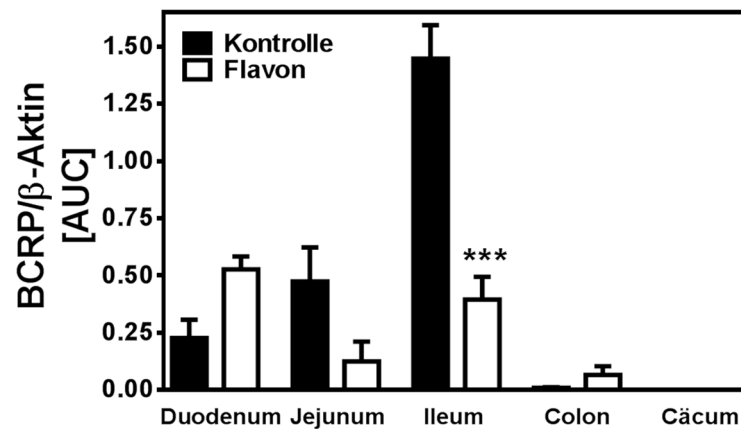
Dargestellt sind Schnitte des Jejunums (**A**) und des Ileums (**B**) von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen, welche das Vehikel erhalten haben (Kontrolle, linke Spalte) und von Flavon behandelten Tieren (rechte Spalte).

Antikörper: rabbit-polyclonal IgG

Fluoreszenzfarbstoff: Alexa-Fluor 488

Die deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals nach Flavonbehandlung wurde durch die densitometrische Auswertung bestätigt. Während die Reduktion des Fluoreszenzsignals im Jejunum zwar sehr deutlich, aber noch nicht signifikant ist, erreicht die Reduktion im Ileum Signifikanzniveau. In Duodenum und Colon kommt es zu einer vermehrten Expression von BCRP nach Flavongabe. Weder in der

Kontrollgruppe noch in der Flavongruppe war im Cäcum der verwendeten Tiere BCRP nachweisbar (Abb. 4.23).



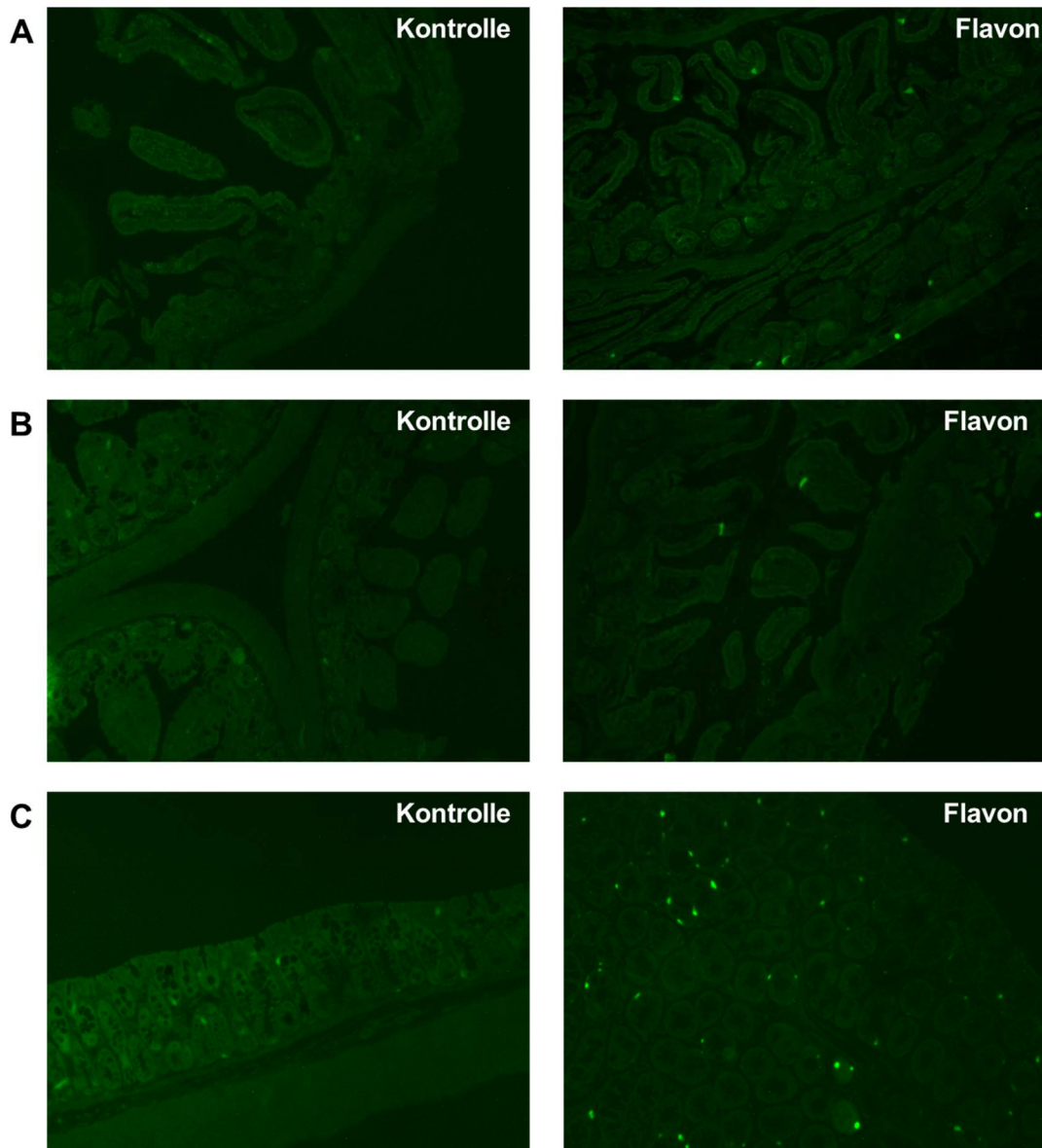
**Abb. 4.23: Exprimierte BCRP Menge im Intestinaltrakt der APC<sup>min/+</sup>-Maus**

Densitometrische Auswertung des Fluoreszenzsignals von jeweils sechs repräsentativen Bereichen immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte. Die BCRP Signalintensität ist auf  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein bezogen.

## 4.7 Inhibierung der Apoptose durch Flavon im Jejunum und Ileum der APC<sup>min/+</sup>-Maus

### 4.7.1 Flavon reduziert die Anzahl Caspase-3 aktiver Zellen

Die Caspase-3 stellt eine Effektorcaspase in der Caspase-Kaskade dar, welche in den betreffenden Zellen nach Aktivierung Apoptose auslöst. Zellen, in denen die Apoptose initiiert wurde, können mit Hilfe eines Antikörpers gegen die prozessierte und damit aktivierte Caspase-3 dargestellt werden. Abb. 4.24 zeigt charakteristische immunhistochemische Färbungen des Jejunums, des Ileums und des Colons. Flavon bewirkt eine deutliche Abnahme der Caspase-aktiven Zellen im Jejunum und im Ileum, wohingegen sich die Anzahl positiv gefärbter Zellen im Colon stark erhöht.

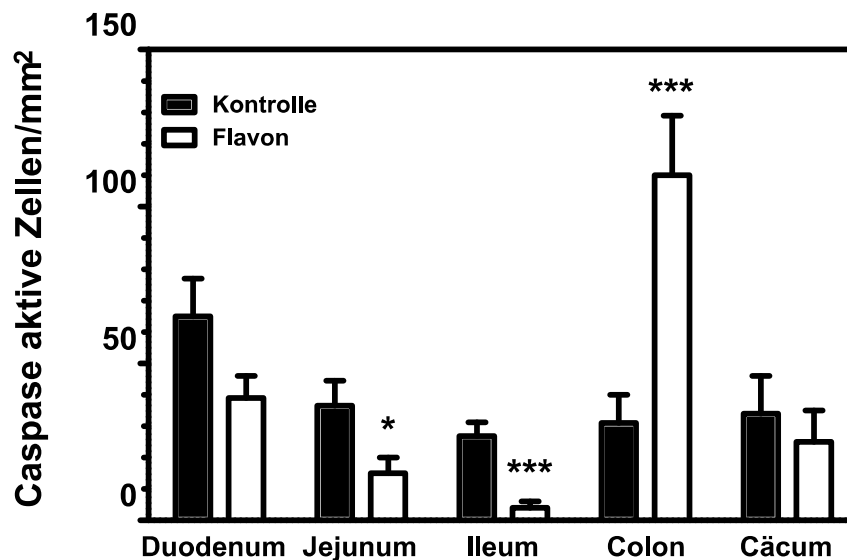


**Abb. 4.24: Immunhistochemischer Nachweis Caspase-aktiver Zellen in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen**

Dargestellt sind Schnitte des Jejunums (**A**), des Ileums (**B**) und des Colons (**C**) von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen, welche das Vehikel erhalten haben (Kontrolle, linke Spalte) und von Flavon behandelten Tieren (rechte Spalte).

Die Auszählung der Caspase positiven Zellen (Abb. 4.25) ergab im Jejunum der Kontrolltiere eine Dichte von  $36,5 \pm 8,0$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Im Jejunum der Flavon behandelten Tiere sind mit  $15,0 \pm 5,1$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  signifikant weniger Caspase-aktive Zellen zu verzeichnen. Dieser Effekt fällt im Ileum deutlicher aus. Hier sinkt die Zellzahl der Caspase-aktiven Zellen pro  $\text{mm}^2$  von  $26,8 \pm 4,4$  bei den Kontrolltieren auf  $4,2 \pm 1,9$  bei Flavon behandelten Tieren. Während sowohl Jejunum wie auch Ileum signifikant weniger Caspase-3 aktive Zellen pro  $\text{mm}^2$  aufweisen, zeigt sich im Colon ein umgekehrter Flavon Effekt. Hier bewirkt Flavon

einen signifikanten Anstieg der Anzahl Caspase-aktiver Zellen von  $31,2 \pm 9,1$  in den Tieren der Kontrollgruppe auf  $112,1 \pm 19,0$ .

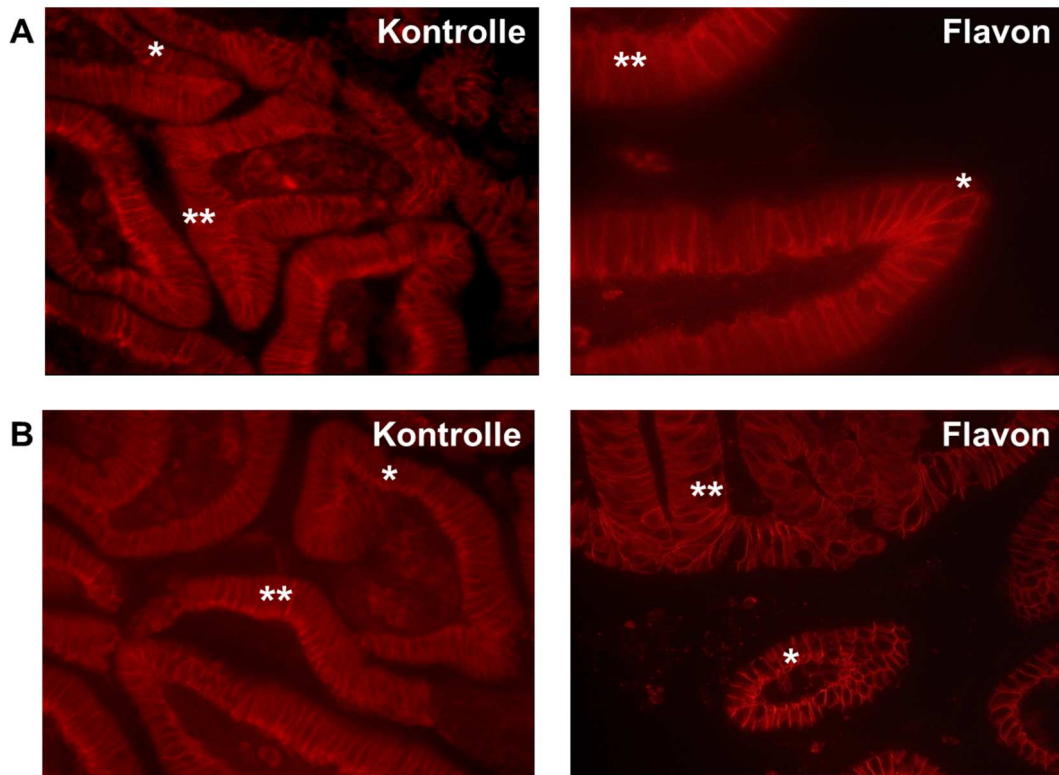


**Abb. 4.25: Anzahl Caspase-aktiver Zellen in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von APC<sup>min/+</sup>-Mäusen**

Von jeweils sechs repräsentativen Aufnahmen eines Gewebeschnittes wurden die Caspase-3 positiven Zellen ausgezählt (\*\*p<0,01).

#### 4.7.2 Die Lokalisierung von $\beta$ -Catenin in der APC<sup>min/+</sup>-Maus wird durch Flavon nicht beeinflusst

$\beta$ -Catenin übt einerseits eine Funktion als entscheidender Transkriptionsfaktor aus, indem es die Transformation von Colonozyten als Folge von APC Mutationen vermittelt. Andererseits wird vermutet, dass durch  $\beta$ -Catenin direkt die Apoptose verhindert wird. Daher wurde die  $\beta$ -Catenin Lokalisation immunhistochemisch in Gewebeschnitten des Jejunums und des Ileums der APC<sup>min/+</sup>-Maus nachgewiesen (Abb. 4.26). In Kontrolltieren, wie auch in der Gruppe der Flavon behandelten Tiere, zeigten die Gewebeschnitte neben Bereichen mit vornehmlicher Lokalisation in der Zellmembran auch Bereiche mit einer diffusen überwiegend zytosolischen  $\beta$ -Catenin Lokalisation. Zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und denen der Flavongruppe waren keine Unterschiede hinsichtlich der Bereiche mit einer diffusen  $\beta$ -Catenin Lokalisation zu verzeichnen. Darüberhinaus korrelieren diese Bereiche einer diffusen zytosolischen  $\beta$ -Catenin Lokalisation mit dem Auftreten von adenomatösem Gewebe.



**Abb. 4.26: Immunhistochemischer Nachweis von  $\beta$ -Catenin in Gewebeschnitten des Intestinaltraktes von  $APC^{min/+}$ -Mäusen**

Exemplarische Darstellung von  $\beta$ -Catenin in Gewebeschnitten des Jejunums (**A**) und des Ileums (**B**). Während  $\beta$ -Catenin in nicht-transformierten Zellen hauptsächlich in der Zellmembran nachweisbar ist (\*), ist es in Bereichen mit überwiegend adenomatösem Gewebe vornehmlich zytosolisch lokalisiert (\*\*).



## 5 Diskussion

### 5.1 Inhibierung der ABC-Transporteraktivität durch Flavon und Chrysin

Flavonoide stellen eine Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe dar, der positive, gesundheitsfördernde Eigenschaften gegenüber Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Krebs nachgesagt werden [120,121]. So konnte für verschiedene Flavonoide nachgewiesen werden, dass sie in Krebszellen die apikalen Effluxtransporter der ABC-Familie inhibieren [122,123,124].

In dieser Arbeit wurden Konzentrationen von 250  $\mu\text{M}$  für die Flavonoide Flavon und Chrysin als potent die Transportaktivität von P-gp hemmend identifiziert. In den folgenden Versuchen konnte eine deutliche Inhibierung auch für die ABC-Transporter MRP-2 und BCRP gezeigt werden. Von der Verwendung höherer Konzentrationen als 250  $\mu\text{M}$  wurde abgesehen, da diese einerseits mit einer schlechteren Löslichkeit der Flavonoide und andererseits mit einer zytotoxischen Wirkung einhergehen könnten [125]. Im Dickdarm wurden darüberhinaus Konzentrationen von bis zu 3 mM bestimmt. Diese Konzentrationen ließen sich im übrigen GIT nicht nachweisen und dürften somit sicherlich eine maximal erreichbare Konzentration im Dickdarm repräsentieren. Im Plasma liegen Flavonoide für gewöhnlich in Konzentrationen von etwa 1 - 2  $\mu\text{M}$  vor [126].

Erhart *et al.* (2005) verwendeten in HCT-116 Colonkarzinomzellen Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  Flavon, um den Flavoneffekt auf die Caspase-Kaskade zu untersuchen. Hierbei zeigten sie auch in einer Konzentrationsreihe, dass die Erhöhung der Flavonkonzentration zu einer Inhibierung des Zellwachstums führt, welche aber auch bei 300  $\mu\text{M}$  noch nicht ihr Maximum erreicht hatte [97]. Die Verwendung von Flavonoidkonzentrationen in CRK-Zelllinien zwischen 150  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  hat sich als geeignet erwiesen um signifikante Effekte auf die Apoptose-Induktion zu erzeugen [97,103,104].

Ein wesentlicher Mechanismus zur Auslösung der Apoptose ist die Inhibierung der ABC-Transporter [53], weil hierdurch Apoptose auslösende Substanzen in der Zelle akkumuliert werden können. Diese Inhibierung der untersuchten ABC-Transporter

wurde mittels Transport spezifischer Fluoreszenzsubstrate überprüft. Sowohl Flavon wie auch Chrysin beeinflussten die Transportaktivität von P-gp, MRP-2 und BCRP und wiesen  $EC_{50}$  Konzentrationen im Bereich von 50  $\mu$ M - 85  $\mu$ M auf. Diese Konzentrationen sind deutlich höher als die von Choi *et al.* (2011) in MCF-7 Brustkrebszellen ermittelte  $EC_{50}$  Konzentration von etwa 10  $\mu$ M [127]. Bei Konzentrationen von 25  $\mu$ M - 100  $\mu$ M konnten Schaubert *et al.* (2003) in den colorektalen Karzinomzelllinien SW 480, SW 620 und HT-29 keine effektive Apoptose-Induktion nachweisen [128]. Im Vergleich zu den verwendeten Konzentrationen an Flavon und Chrysin in den unterschiedlichen Zelllinien bei Choi *et al.* (2011) und Schaubert *et al.* (2003), stellen die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen auf Basis der ermittelten  $EC_{50}$ -Werte einen Ansatz zur erfolgreichen Apoptose-Induktion in Caco-2 Zellen dar, der sich an den Arbeiten von Wenzel *et al.* [102], sowie Kuntz *et al.* [103] orientiert.

Bezüglich der Topotecanakkumulation haben sich beide Flavonoide ebenfalls als geeignete Effektoren dargestellt. Hier bewegen sich die  $EC_{50}$  Konzentrationen bei 100  $\mu$ M bis 135  $\mu$ M. Katayama *et al.* (2007) untersuchten ebenfalls den Topotecanefflux in Abhängigkeit von ABC-Transportern. In den dort verwendeten Leukämie- und Epidermoidzellen wurden P-gp, BCRP und MRP-1 untersucht. In diesen Zelllinien konnte Chrysin (10  $\mu$ M) lediglich den Topotecanefflux über BCRP verhindern. Während 3',4',7-Trimethoxyflavon und Acacetin, aber nicht Chrysin, P-gp inhibieren konnten, wurde bei Katayama *et al.* (2007) MRP-1 von keinem Flavonoid inhibiert [90]. Hier scheinen sich teilweise widersprüchliche Flavonoeffekte widerzuspiegeln, die beispielsweise auch Mitsunaga *et al.* (2000) beobachteten. Während manche Flavonoide, wie auch Chrysin in Konzentrationen von 10  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M in endothelialen Gehirnzellen von Mäusen die Aufnahme von Vincristin erhöhten, zeigten andere Flavonoide dort in Abhängigkeit der applizierten Konzentration sowohl aktivierende wie auch inhibierende Effekte [129]. Die Ergebnisse dieser Arbeit können hinsichtlich einer vermehrten Topotecanaufnahme aufgrund einer reduzierten ABC-Transporteraktivität nicht nur durch die Befunde von Mitsunaga *et al.* (2000) bestätigt werden, sondern auch durch die Arbeit von Choi *et al.* (2011). Hier führte die gleichzeitige Applikation des Flavonoids Quercetin und des Anthracyclins Doxorubicin in Ratten zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs [127].

## 5.2 Wechselwirkungen der Flavonoide Flavon und Chrysin mit ABC-Transportern der apikalen Enterozytenmembran

Das größte Problem der effizienten Krebstherapie ist die Entstehung von Resistenzen gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapeutika. Für diese MDR werden vor allem die Efflux-Pumpen aus der Familie der ABC-Transporter verantwortlich gemacht [130]. Die Suche nach Substanzen, welche mit ABC-Transportern interagieren und im Gegensatz zu Medikamenten der ersten Generation wesentlich weniger Nebeneffekte aufweisen, hat eine Vielzahl natürlicher Stoffe hervorgebracht [131]. Flavonoide stellen hier vielversprechende, natürlich vorkommende Substanzen dar, mit deren Hilfe diese Resistenzen umgangen oder zumindest geschwächt werden könnten [122,132].

Viele Flavonoide scheinen als Substrate für die Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP zu fungieren und die MDR durch kompetitive Hemmung zu unterdrücken [122]. Andererseits haben Lohner *et al.* (2007) gezeigt, dass verschiedene Flavonoide in der Lage sind die P-gp Expression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu erhöhen [134]. Während die Expression der ABC-Transporter in gesunden Zellen der Exkretion von Xenobiotika dienen kann, könnte dies für Karzinomzellen bedeuten, dass beispielsweise Flavonoide zur Entstehung einer MDR beitragen, indem sie selbst als Xenobiotika wahrgenommen werden und neben Phase-II auch Phase-III potent induzieren [134,135].

In dieser Arbeit ist es gelungen zu zeigen, dass die Flavonoide Flavon und Chrysin im Caco-2 Zellmodell die apikalen ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP dosisabhängig inhibieren. Das Chemotherapeutikum Topotecan scheint von diesen drei Transportern ausgeschleust zu werden, da spezifische Inhibitoren der Transporter allesamt Akkumulationsanstiege von Topotecan bewirkten. Lediglich die Kombination der Inhibitoren führt zu einem ähnlich hohen Anstieg der Topotecankonzentration wie sie die Flavonoide Flavon und Chrysin verursachen. Für verschiedene Flavonoide wurde bereits nachgewiesen, dass sie in der Lage sind die P-gp Aktivität zu inhibieren, indem sie die ATP-Bindung durch Überlagerung verhindern [117]. Die Unterbindung der ATPase-Aktivität würde schließlich zu einem Anstieg des Zytostatikums Topotecan in den Caco-2 Zellen führen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte intrazelluläre Topotecanakkumulation wäre das Modell von Shapiro *et al.* (1997), wonach P-gp zwei Bindungsstellen für Pharmaka unterhält; die H-Bindungsstelle, welche Hoechst-33342 als Bindungspartner bevorzugt, und die R-Bindungsstelle, die bevorzugt Rhodamin-123 bindet. Beide Bindungsstellen kooperieren miteinander, indem sie ihre Aktivität gegenseitig stimulieren [63]. Sollte nun die entsprechende Bindungsstelle für Topotecan durch die beiden Flavonoide Flavon oder Chrysin blockiert sein, würde dies die erhöhte Akkumulation erklären. Sowohl Flavon als auch Chrysin scheinen demnach die Anforderungen an ein effizientes Mittel mit MDR umkehrendem Potential zu erfüllen, denn durch beide Flavonoide wird der Topotecanefflux deutlich vermindert, indem sie offenbar alle drei Effluxpumpen inhibieren. Ein vergleichbares Ergebnis erzielten 2008 Izuta *et al.* in Neuroepitheliomzellen. Hier bewirkte Chrysin einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Tunicamycin-Konzentration, wodurch schließlich vermehrt Apoptose in diesen Zellen ausgelöst werden konnte [136].

Ähnliche Ergebnisse dürften auch unter *in vivo* Bedingungen erwartet werden, da einerseits die eingesetzten Polyphenolkonzentrationen im Intestinaltrakt durch eine normale obst- und gemüsereiche Diät als erreichbar angesehen werden [137,138] und andererseits eine gleichzeitige orale Gabe von Flavon und dem antineoplastisch wirkenden Paclitaxel bei Ratten zu einer deutlichen Steigerung der Bioverfügbarkeit von Paclitaxel führte [139]. Ein vergleichbares Ergebnis konnte der gleiche Autor 2011 durch die Kombination von Quercetin und Doxorubicin erzielen [126].

Die Transportinhibition durch Flavon und Chrysin scheint trotz der beobachteten gestiegenen Expression aller drei Transporter persistierend zu sein, da der Akkumulationsanstieg von Topotecan auch unter gesteigener Expression nachweisbar war. Trotz der gestiegenen Akkumulation des Apoptose induzierenden Topotecans fand interessanterweise durch beide Flavonoide eine Hemmung der Apoptose statt.

### 5.3 Einfluss von Flavon und Chrysin auf die Proliferation und die Differenzierung von Caco-2 Zellen

Neben der Apoptose stellen die Differenzierung und die Proliferation weitere zentrale Parameter der Karzinogenese dar, welche zur Beurteilung der Vitalität von Zellen herangezogen werden können. Daher wurde hier der Einfluss von Flavon und Chrysin auf die verwendeten Caco-2 Zellen getestet.

Bestimmte Nahrungsinhaltsstoffe wie Butyrat sind in der Lage in Zellkulturen die Differenzierung zu fördern. Zusätzlich besitzen sie noch das Potential aberrante Zellen bereits in einem frühen Stadium der Tumorbildung zu eliminieren [140]. Butyrat hat hier die AP-Aktivität erhöht und damit auch die Differenzierung in Caco-2 Zellen effektiv induziert. Während beide Flavonoide gleichermaßen effektiv eine Blockade der Topotecan-induzierten Apoptose bewirken, zeigen sie auch eine potente Hemmung der durch Butyrat-induzierten Differenzierung der Caco-2 Zellen. Ausserdem hemmen beide Flavonoide die Proliferation der Caco-2 Zellen signifikant.

Die vermehrte AP-Aktivität nach Butyratinkubation wird nach Gaschott *et al.* (2001) vermutlich durch eine verstärkte Expression des Proteins p21 verursacht [141]. Da p21 zu einem Zellzyklus Arrest führt, wird somit die Proliferation gehemmt [94]. Ähnlich wie bei Wenzel *et al.* (2000) [103] zeigt sich Flavon hier, ebenso wie Chrysin, als Inhibitor der Proliferation. Lediglich die Differenzierung scheint Flavon nicht zu beeinflussen, während Flavon in HT-29 Zellen eine stark signifikante Erhöhung der AP-Aktivität bewirkt, bleibt diese in Caco-2 Zellen nahezu unbeeinflusst. Hier zeigt sich Chrysin allerdings als potentes Stimulans und erhöht die AP-Aktivität. Die Stärke der Aktivierung durch Chrysin scheint folglich dominant zu sein und sich bei Differenzierung und Proliferation gegenüber Butyrat bzw. Topotecan durchzusetzen. Demnach könnte p21 eine mögliche Ursache für die stimulierte AP-Aktivität und die reduzierte Proliferation darstellen.

Die Zellproliferation wird durch eine vermehrte Transkription bestimmter Zielgene wie z.B. *Cyclin D1* gefördert, welches in vielen CRK-Zelllinien überexprimiert wird [142]. Hier ist eine Aktivierung des Zellzyklus kontrollierenden Cyclin D1 durch ein wnt-Signal möglich [143]. Allerdings ist im Zusammenhang mit dem

wnt-Signalweg auch eine Hemmung der Proliferation durch Flavonoide möglich. Flavonoide wie Quercetin oder Apigenin können durch eine Hemmung der Caseinkinase als Regulator des wnt-Signalweges wirken [144]. Hierdurch ließe sich die in dieser Arbeit beobachtete Hemmung der Proliferation erklären, die ebenfalls von Zhu *et al.* (2010) in der Colonkarzinomzelllinie HCT-116 beobachtet wurde [145]. Dies würde die vermutete p21 Beteiligung zumindest dahingehend unterstützen, da es sich bei p21 um einen Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen handelt, der die Phosphorylierung von Cyclin D1 und damit den weiteren Ablauf des Zellzyklus verhindert [50].

## **5.4 Einfluss von Flavon und Chrysin auf die Apoptose in Caco-2 Zellen**

Weder Flavon noch Chrysin waren in der Lage in Caco-2 Zellen Apoptose auszulösen. In verschiedenen Studien ist es gelungen eine Induktion der Apoptose durch Flavon und Chrysin in Krebszellen nachzuweisen [102,136]. In der HT-29 Zelllinie sind Flavonoide in der Lage potent Apoptose zu induzieren [102]. Allerdings exprimieren diese Zellen P-gp nur marginal [146], während in den hier verwendeten Caco-2 Zellen ein deutlicher P-gp Nachweis erfolgte. Basierend auf den Befunden von Tainton *et al.* (2004) mit transportdefizientem P-gp ließe sich die verminderte Apotoserate hier durch die erhöhte P-gp Expression erklären. Demnach wäre die Inhibierung der Apoptose auf die reduzierte Freisetzung von Cytochrom c in Folge einer verminderten Caspase-Aktivität durch die erhöhte P-gp Expression zurückzuführen [147].

Einen möglichen weiteren Erklärungsansatz liefern Dudeja *et al.* (2009) [148]. Basierend auf früheren Arbeiten, in welchen gezeigt wurde, dass sowohl Calcium als auch lysosomale Enzyme als Aktivatoren Caspase-abhängiger Signalwege in verschiedenen Zellsystemen wirken [149,150], ist es ihnen gelungen eine Inhibierung der Apoptose durch Apigenin zu zeigen. Mechanistisch machen sie für die verminderte Apotoserate eine zeitgleiche und voneinander unabhängige Reduktion der zytosolischen Calciumkonzentration und Stabilisierung der Lysosomen durch das Hitzeschockprotein HSP70 verantwortlich [148]. Durch diese beiden möglichen Wege kommt es zu einer Verminderung der Caspase-3 und der Caspase-8-Aktivität. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen

ebenfalls eine Reduktion der Caspase-3 und der Caspase-8-Aktivität, wodurch eine Beteiligung von HSP70 wahrscheinlich erscheint, da der HSP70 Nachweis in Caco-2 Zellen von Schmid *et al.* (2008) erbracht wurde [151]. In der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wird von Izuta *et al.* (2008) ebenfalls eine Inaktivierung der Caspase-3 für eine verminderte Apoptoserate durch Chrysin verantwortlich gemacht [136]. Nachdem die Zellen mit Chrysin behandelt wurden, zeigten sie, ähnlich wie die hier verwendeten Caco-2 Zellen, eine konzentrationsabhängige Reduktion der Tunicamycin-induzierten Apoptose. Die von Izuta *et al.* (2008) bestimmte Caspase-3 Expression war deutlich reduziert [136], was wiederum ihre geringere Aktivität erklärt und damit eine Beteiligung von HSP70 ermöglicht.

Klassische humane Karzinomzelllinien, welche hohe P-gp Spiegel aufweisen, haben sich als weniger sensitiv gegenüber dem Caspase-vermittelten Zelltod, einschließlich dem über Fas-Rezeptoren vermittelten, herausgestellt [152]. Die Caspase-Aktivität verlangt ihrerseits eine Ansäuerung des intrazellulären pH-Wertes [153]. P-gp kann aber vermutlich anti-apoptotisch durch eine Vermeidung der intrazellulären pH-Verschiebung in den sauren Bereich wirken [52,154], wodurch sich die verminderte Apoptoserate erklären ließe. Allerdings reduziert auch eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes durch die Base Imidazol die Topotecan-vermittelte Caspase-Aktivität und, damit verbunden, die Auslösung der Apoptose in Caco-2 Zellen nicht [155]. Hierdurch ist schließlich der Nachweis erbracht, dass ein niedriger intrazellulärer pH-Wert für eine Caspase-Aktivierung nicht unabdingbar erforderlich ist.

## **5.5 Auswirkungen einer Flavon- und Chrysinbehandlung auf die $\beta$ -Catenin Stabilität und die zelluläre Lokalisation**

Die Inhibierung der Apoptose ist in Colonozyten als  $\beta$ -Catenin abhängig beschrieben.  $\beta$ -Catenin ist ein Transkriptionsfaktor des wnt-Signalweges, der in der Entwicklung des CRK fehlreguliert ist [156,157]. Da  $\beta$ -Catenin durch die Caspase-3 degradiert werden kann [158], ist der Einfluss von Flavon und Chrysin sowohl auf dessen Stabilität, als auch auf dessen zelluläre Lokalisation getestet worden. Die Degradierung dieses Tumorpromotors, wie sie Topotecan verursacht, wird

einerseits von beiden Flavonoiden deutlich inhibiert. Andererseits bewirken Flavon und auch Chrysin eine Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Nukleus, während die zelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin durch Topotecan kaum beeinflusst wird. Dies zeigt sich auch bei einer Kombination von Topotecan mit beiden Flavonoiden. Da ein Inhibitor der Caspase-3 die Degradierung von  $\beta$ -Catenin, ebenso verhindert wie die Apoptose [158], muss hier vermutet werden, dass die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin der Hauptmechanismus ist, welcher dem Flavon- und Chrysineneffekt für das Überleben der Karzinomzellen zugrunde liegt. Steinhilber *et al.* (2000) vermuten, dass eine wichtige Funktion der  $\beta$ -Catenin Spaltung darin besteht, dass es seine Funktion als Transkriptionsfaktor verliert [158]. Die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin könnte schließlich übermittlelt werden in eine verstärkte Expression der untersuchten ABC-Transporter. Im Falle von P-gp ist dies auch schon in Endothelzellen des Gehirns für dessen Promotor nach Aktivierung durch  $\beta$ -Catenin gezeigt. Auch für MRP-4, wie MRP-2 ein Mitglied der ABCC-Subfamilie der ABC-Transporter, und BCRP ist eine gesteigerte Expression durch Aktivierung des wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges nachgewiesen [159]. Hierdurch wird der Schluss nahegelegt, dass stabilisiertes  $\beta$ -Catenin bestimmte ABC-Transporter durch Promotoraktivierung aktiviert.

$\beta$ -Catenin beeinflusste zusätzlich die Differenzierung in Caco-2 Zellen. Unter diesem Blickwinkel wird die verstärkte Lokalisation von  $\beta$ -Catenin in der Plasmamembran von Kirkland *et al.* (2009) ebenso wie von Mariadason *et al.* (2001) mit einer erhöhten Differenzierungsrate in Verbindung gebracht [160,161]. Für Butyrat ist eine stimulierende Wirkung von  $\beta$ -Catenin in der Zellmembran von Colonkarzinomzellen nachgewiesen. Dies legt eine mögliche Rolle von Butyrat als differenzierungsstimulierendes Agens über steigende membranäre  $\beta$ -Catenin Spiegel, welche für die Zelladhäsion zur Verfügung stehen, nahe [162]. Eine direkte Involvierung von  $\beta$ -Catenin in die Differenzierung scheint aber eher unwahrscheinlich, da Butyrat zu identischen Lokalisierungsergebnissen führte wie Topotecan [163]. Während jedoch beide Substanzen in der Lage sind potent Apoptose zu induzieren, führt lediglich Butyrat zu einem Anstieg der Differenzierung. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass Flavon und Chrysin ihre inhibitorischen Eigenschaften auf die Butyrat-induzierte Differenzierung über eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und einen damit verbundenen



Expressionsanstieg der ABC-Transporter äußern. Für P-gp ist schon 1991 durch Chaudhary und Roninson eine Beteiligung an der Regulierung der Differenzierung vermutet worden. In pluripotenten Stammzellen konnte in diesem Zusammenhang eine verminderte P-gp Expression als ursächlich für eine damit einhergehende reduzierte Differenzierung postuliert werden [164].

## **5.6 Die APC<sup>min/+</sup>-Maus als Modell der colorektalen Karzinogenese**

### **5.6.1 Einfluss von Flavon auf die Adenomlast im Intestinum der APC<sup>min/+</sup>-Maus**

Eine Reihe von Studien an Nagern, bei welchen chemisch ein CRK induziert wurde, hat gezeigt, dass verschiedene Flavonoide in der Lage sind die Progression des Karzinoms aufzuhalten [134,165,166]. Die hier verwendete APC<sup>min/+</sup>-Maus dient allgemein als Modell der humanen familiären adenomatösen *Polyposis coli* [167] und besitzt eine autosomal dominant vererbte Mutation des murinen APC-Gens. Sie neigt daher zur Genese multipler Neoplasien im gesamten Intestinum [168], so dass die Notwendigkeit Adenome chemisch zu induzieren hier nicht besteht. Allerdings bilden diese Tiere wesentlich mehr Adenome im Dünndarm als im Dickdarm. Die Tiere haben in dem durchgeführten Versuch deutlich mehr Adenome nach Flavonbehandlung gezeigt, als dies zu erwarten gewesen wäre [134].

Cai *et al.* (2009) haben ihrerseits bei der APC<sup>min/+</sup>-Maus den Effekt des Flavonoids Tricin (4',5,7-Trihydroxy-3',5'-Dimethoxyflavon) auf die colorektale Karzinogenese untersucht [169]. Während sowohl die Kontrollgruppe, als auch die Tricin Gruppe, bei Cai *et al.* deutlich weniger Adenome im Dünndarm aufweisen als die hier verwendeten Tiere, finden sich ähnliche Adenomzahlen im Colon. Im Dünndarm allerdings haben Cai *et al.* das Ergebnis einer rückläufigen Adenomlast durch die Tricingabe gezeigt. Die tendenziell verringerte Anzahl vorgefundener Adenome, im Dünndarm, wie im Dickdarm, könnte auf den längeren Versuchszeitraum zurückzuführen sein. Auffällig sind die Standardabweichungen von Cai *et al.*, die ebenso wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen verhältnismäßig groß sind. In der genannten Arbeit wird eine mäßige Reduktion der COX-Aktivität durch Tricin für die verminderte Anzahl an

mittleren (1-3 mm Durchmesser) und großen Adenomen (> 3 mm Durchmesser) verantwortlich gemacht [169]. Diese Eigenschaften lassen sich für die Flavonoide Apigenin und Quercetin nicht nachweisen. Beide Flavonoide sind in der Lage die COX-Expression, aber nicht deren Aktivität zu vermindern [170,171]. Die Wahrscheinlichkeit, dass es durch Flavon zu einer Reduktion der COX-2 Expression kommt, ist als relativ unwahrscheinlich anzusehen, da die COX-2 ein Zielgen von  $\beta$ -Catenin (TCF/LEF) ist, das durch beide Flavonoide stabilisiert wird [172]. Des Weiteren hat sich bei Cai *et al.* auch für Apigenin nicht der Nachweis erbringen lassen die Adenomlast zu reduzieren [169]. Sie machen für eine effektive Adenomprävention durch Flavonoide Hydroxylgruppen und vor allem Methylgruppen verantwortlich. Die Beobachtung, dass Apigenin die Adenomzahl in der APC<sup>min/+</sup>-Maus nicht reduziert, wird ebenfalls von Au *et al.* (2006) bestätigt [173].

Davon ausgehend, dass der protektive Effekt von Flavonoiden von ihren Methoxygruppen abhängt, würde dies erklären, warum Flavon einen solchen Effekt ebenfalls nicht hervorruft. Auch Genistein besitzt in der APC<sup>min/+</sup>-Maus keinerlei Effekt auf die Adenomzahl oder -lokalisation. Vielmehr wirkt Genistein in Kombination mit (-)-Epigallocatechin-3-Gallat stimulierend auf die Adenombildung. Lambert *et al.* (2008) schließen hier unabhängig von ABC-Transportern assoziierte Mechanismen nicht aus [174].

### **5.6.2 Einfluss von Flavon auf die Expression der ABC-Transporter P-gp, MRP-2 und BCRP im Intestinum der APC<sup>min/+</sup>-Maus**

Da zumindest für P-gp bereits eine Apoptose inhibierende Aktivität postuliert wurde [154], sollte hier die Expression sowohl von P-gp wie auch von MRP-2 und von BCRP im Intestinum der APC<sup>min/+</sup>-Maus nach Flavonapplikation untersucht werden. Die flavonbehandelten Tiere zeigen gegenüber den Kontrolltieren im Jejunum und Ileum eine erhöhte P-gp Expression, welche durch die enormen individuellen Schwankungen keine Signifikanz erreichte. Zumindest in Wildtyp Mäusen, welche über vier Wochen mit Flavon schlundiert wurden (400 mg/kg Körpergewicht) wurde im Dünndarm eine erhöhte P-gp Expression gefunden. Währenddessen zeigten diese Tiere im Dickdarm eine insgesamt höhere Expression, die allerdings keine Modulation durch Flavon zeigte [134]. In der APC<sup>min/+</sup>-Maus konnten Yamada *et al.* (2003) eine vermehrte P-gp Lokalisation in adenomatösem Gewebe feststellen

[175]. Dieses Verteilungsmuster konnte von Dietrich *et al.* (2011) nicht bestätigt werden, hier fanden sich für P-gp weder in Human-Proben noch in der APC<sup>min/+</sup>-Maus unterschiedliche Verteilungsmuster zwischen gesundem und adenomatösem Gewebe. Während MRP-2 sowohl in Adenomen wie auch im Intestinaltrakt kaum nachweisbar ist, wird BCRP in Adenomen deutlich herabreguliert. Hinsichtlich der BCRP Menge fanden sich keinerlei Unterschiede in den einzelnen Segmenten des Intestinaltraktes [176]. Die MRP-2- und BCRP-Spiegel haben sich in dieser Arbeit gegenüber dem P-gp Spiegel zumindest teilweise als relativ niedrig bzw. kaum detektierbar erwiesen. Dies würde mit den Befunden von Dietrich *et al.* (2011) dahingehend übereinstimmen, da hier für die Auswertung die Fluoreszenzintensität der gesamten Gewebeschnitte analysiert wurde. Im Dünndarm zeigt sich trotz der geringen MRP-2 Menge in der APC<sup>min/+</sup>-Maus nach Flavonapplikation ein leichter Rückgang der Expression im Jejunum und ein deutlicher im Ileum. Ähnliche Ergebnisse zeigten 2001 schon Rost *et al.* (2002) in der Ratte. Die Expressionsmenge nimmt auch in der Ratte vom Jejunum zum Ileum hin ab, während im Colon kein MRP-2 mehr nachweisbar ist [177], zeigt die APC<sup>min/+</sup>-Maus hier noch geringe Mengen im immunhistochemischen Nachweis. Da MRP-2 und BCRP im Jejunum und Ileum teilweise erniedrigt aber an keiner Stelle erhöht wurden, erscheint ihr Beitrag an der Entstehung größerer Adenome durch Flavon *in vivo* eher fraglich.

Insgesamt zeigt sich die Expression aller drei ABC-Transporter in der Zellkultur deutlich stärker durch Flavon induziert als in der APC<sup>min/+</sup>-Maus. *In vitro* konnten hier Steigerungen der Expression von bis zu 540% erreicht werden, wohingegen dies *in vivo* im Allgemeinen deutlich geringer ausfällt. Die geringere Effizienz von Flavon könnte im *in vivo* Experiment auf eine geringe Bioverfügbarkeit zurückzuführen sein. So wurde für das Flavonoid Baicalain in der Ratte gezeigt, dass es von der Effluxpumpe MRP-2 aus den Mukosazellen in das Lumen transportiert wird [178], auch wenn MRP-2 hier nur marginal exprimiert wird, wäre ein solcher Mechanismus prinzipiell für das etwas stärker exprimierte P-gp oder das Zusammenspiel aller ABC-Transporter vorstellbar. Darüberhinaus wäre auch vorstellbar, dass Flavon *in vivo* in wirkungslose Metabolite konvertiert wird [179,180] und dadurch ebenfalls keine ausreichende Wirkkonzentration in den intestinalen Zellen zur Verfügung steht, um ähnliche Effekte wie *in vitro* hervorufen zu können.

### 5.6.3 Einfluss von Flavon auf die Apoptose im Intestinum der APC<sup>min/+</sup>-Maus

Da eine hohe Anzahl an Adenomen im Jejunum und im Ileum der APC<sup>min/+</sup>-Mäuse auftrat, wurde die Apoptoserate bestimmt. Winkelmann *et al.* (2010) wiesen bei chemisch induzierten Adenomen in C57BL/6J Mäusen eine Reduktion der Apoptose nach [181]. Immunhistochemisch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass speziell in den Bereichen großer Adenome im Jejunum und Ileum durch Flavon die Apoptose inhibiert wurde. Dem gegenüber steht ein Anstieg der Apoptoserate im Colon durch Flavon, wie er auch in Wildtyp-Mäusen, welche mit dem Karzinogen Dimethylhydrazin behandelt wurden, beobachtet werden konnte [181]. Dies lässt unterschiedliche Reaktionen der Enterozyten verschiedener Darmregionen gegenüber einer Flavonexposition vermuten. Da nun aber die meisten Adenome in der APC<sup>min/+</sup>-Maus im Dünndarm entstehen, muss die Eignung dieses Maus-Modells als Modell für die humane colorektale Karzinogenese gegebenenfalls überprüft werden.

APC-Mutationen werden mit einer zellulären  $\beta$ -Catenin Stabilisierung in Zusammenhang gebracht. Hierbei könnte  $\beta$ -Catenin nicht nur als Transkriptionsfaktor in der colorektalen Karzinogenese fungieren, sondern auch durch seine zelluläre Verteilung im Falle einer verminderten Lokalisation in der Plasmamembran eine daraus folgende verminderte Zell-Zelladhäsion bewirken [24]. Während  $\beta$ -Catenin bei den hier verwendeten Tieren im gesunden Gewebe überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert war, fand es sich in adenomatösem Gewebe hauptsächlich im Zytosol. Eine Behandlung der Versuchstiere mit Flavon zeigte keinerlei Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin. Dies legt nahe, dass es sich bei einer stark verringerten oder gar fehlenden  $\beta$ -Catenin Fokussierung in der Plasmamembran entweder um ein relativ spätes Stadium der Transformation handelt, oder diese hierfür nicht unbedingt notwendig ist. Das zytosolische Auftreten von  $\beta$ -Catenin konnte von Kobayashi *et al.* (2000) auch für menschliches Gewebe bestätigt werden. Allerdings sehen sie es als wahrscheinlich an, dass es sich bei der zytosolischen  $\beta$ -Catenin Anreicherung um einen Prozess der Tumorgenese handelt. Dieser Prozess könnte ihrer Ansicht nach sowohl Ursache wie auch Konsequenz der Progression vom Adenom bis zum manifesten Karzinom sein [182].

Ein Mechanismus, über den  $\beta$ -Catenin die Entstehung eines CRK vorantreiben könnte, wäre die Vermittlung einer vermehrten P-gp Expression durch Aktivierung des P-gp Promotors [159]. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass  $APC^{min/+}$ -P-gp<sup>-/-</sup> doppel-knockout Mäuse signifikant weniger Adenome entwickeln als  $APC^{min/+}$ -Mäuse [175]. Darüberhinaus zeigten sich mit mutiertem P-gp transfizierte Zellen nicht fähig P-gp Substrate zu transportieren. Wohl aber zeigten diese Zellen eine transportunabhängige Inhibierung der Apoptose durch eine stark verringerte Caspase-Aktivität [147]. Gleichzeitig zeigen Zellen, die hohe P-gp Spiegel aufweisen, auch eine geringe Sensitivität gegenüber verschiedene Formen des Caspase-vermittelten Zelltodes, die durch den P-gp vermittelten Transport nicht beeinflusst werden [152]. Es wurde eine Tendenz für eine vermehrte P-gp Expression im Jejunum und im Ileum bei den hier verwendeten Tieren gezeigt. Bedingt durch die großen individuellen Schwankungen konnte hier kein signifikanter Nachweis als mögliche Ursache für die beobachtete Apoptose Inhibierung erfolgen. Dieser Nachweis gelang allerdings *in vitro* im Caco-2 Modell.

#### 5.6.4 Beurteilung der $APC^{min/+}$ -Maus als geeignetes Modell der colorektalen Karzinogenese

Eine Mutation des APC-Gens tritt in etwa 80% aller Fälle humaner CRK auf [183] und wird für eine verminderte Aktivierung des wnt-Signalweges verantwortlich gemacht [184]. Diese Charakteristika sind in der  $APC^{min/+}$ -Maus bereits bewiesen und trotz einer massiven Bildung von Adenomen im Dünndarm anstelle des Dickdarms wird die  $APC^{min/+}$ -Maus allgemein als geeigneter Modellorganismus der colorektalen Karzinogenese angesehen. So zeigen sich morphologische Ähnlichkeiten der Adenome zwischen der  $APC^{min/+}$ -Maus und denen des Menschen. Daher könnte sie ein geeignetes Modell der familiären adenomatösen *Polyposis coli* darstellen (FAP) [185]. Obwohl dieses Maus-Modell vor nunmehr zwanzig Jahren beschrieben wurde [168] und seither tatsächlich als Modell der FAP und auch der spontanen colorektalen Karzinogenese dient, ist sie, zumindest bezüglich der Aussagekraft der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente kritisch zu betrachten. Die Tiere zeigen enorme individuelle Schwankungen in den Expressionsmustern der ABC-Transporter, sowohl in Western Blot Experimenten, als auch im immunhistochemischen Nachweis, wodurch es nicht möglich war signifikante Unterschiede festzustellen. Zusätzlich zu diesen ungünstigen

Eigenschaften ist die Adenomlast nach Flavonbehandlung gestiegen. Ausgehend von den Ergebnissen der Caco-2 Experimente, die darauf hindeuten, dass die vermehrte Anzahl von Adenomen auf eine  $\beta$ -Catenin Stabilisierung und eine vermehrte P-gp Expression durch Inhibierung der Apoptose zurückzuführen ist, scheint es sich um einen für den Dünndarm spezifischen Effekt in der APC<sup>min/+</sup>-Maus zu handeln. Aus diesem Grunde sollte für die Aufklärung der Tumorgenese die Verwendung anderer bzw. zusätzlicher Mausmodelle in Erwägung gezogen werden. Hier könnten sich Modelle anbieten, welche durch mutiertes k-ras vermehrt Adenome im Dickdarm entwickeln [186].

## 6 Zusammenfassung

Die erhöhte Expression ATP-abhängiger Effluxpumpen, wie des Phosphoglykoproteins-170 (P-gp), des Multidrugresistance related proteins-2 (MRP-2) oder des Breast cancer resistance proteins (BCRP), im Tumorgewebe reduziert die intrazellulären Konzentrationen der transportierten Tumortheraeutika. Damit wird die Prognose einer erfolgreichen Therapie von Krebserkrankungen verschlechtert. Flavonoide aus Pflanzen könnten potente Inhibitoren der ABC-Transporter darstellen und sich somit als reversing agents einer Vielfachresistenz gegenüber applizierten Zytostatika erweisen.

In der vorliegenden Arbeit erhöhten Flavon und Chrysin die Expression von P-gp, MRP-2 und BCRP und reduzierten gleichzeitig ihre Transporteraktivität in humanen intestinalen Caco-2 Zellen. Letzteres wurde anhand der gesteigerten Akkumulation der Fluoreszenzsubstrate Rhodamin-123 (P-gp), CMFDA (MRP-2) und Hoechst-33342 (BCRP) in Anwesenheit der beiden Flavonoide gezeigt. Darüberhinaus bewirkten beide Flavonoide eine erhöhte Akkumulation des Chemotherapeutikums Topotecan in den verwendeten Caco-2 Zellen. Trotz erhöhter Akkumulation des Apoptose induzierenden Wirkstoffs, wurde die anhand von Chromatinkondensation detektierte Apoptose dosisabhängig durch die Flavonoide gehemmt. Die anti-apoptotische Wirkung beider Flavonoide war assoziiert mit einer Reduktion der Aktivitäten der Caspasen-3 und -8 und einer Stabilisierung des zytosolischen  $\beta$ -Catenins. Diese Stabilisierung könnte nach nukleärer Translokation des  $\beta$ -Catenins ursächlich sein für die erhöhte Expression der ABC-Transporter. Insgesamt ist eine transportunabhängige, Apoptose inhibierende Aktivität der untersuchten Effluxpumpen zu postulieren.

Als *in vivo* Modell zur Untersuchung der Effekte einer Verfütterung von Flavon auf die colorektale Karzinogenese wurden APC<sup>min/+</sup>-Mäuse ausgewählt. Die Gabe von Flavon erhöhte die Anzahl und die Größe der Adenome im Jejunum und Ileum. Immunhistochemische Analysen zeigten, dass in diesen Darmabschnitten die P-gp Expression anstieg. Gleichzeitig nahm die Anzahl Caspase-3 positiver, in Apoptose befindlicher Zellen ab. Hierdurch wurde die *in vitro* entdeckte Inhibierung der Caspase-Kaskade als zugrunde liegender Mechanismus für eine Inhibierung der

Apoptose durch Flavon *in vivo* bestätigt. Allerdings nahm sowohl die Menge an exprimiertem MRP-2 wie auch BCRP im Dünndarm ab. Im Mausmodell beschränkt sich die transportunabhängige und gleichzeitig Apoptose inhibierende Aktivität auf P-gp.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erhöhte Expression von ABC-Transportern, insbesondere von P-gp, in intestinalen Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit einer Reduktion der Apoptose verbunden waren. Als ursächlich hierfür konnte die Inhibierung der Caspase-3 gemacht werden, die selbst unter erhöhter Akkumulation Apoptose auslösender Chemotherapeutika präsent war.



## 7 Abstract

An increased expression of ATP-dependent efflux pumps, such as phosphoglycoprotein-170 (P-gp), multidrugresistance related protein-2 (MRP-2) or breast cancer resistance protein (BCRP) in tumorous tissues lead to decreased cytosolic concentrations of transported chemotherapeutic drugs. This is associated with a poor prognosis for successful anticancer therapy. Polyphenolic plant compounds, such as flavonoids, could act as beneficial and potent targets in inhibiting these transporters. They could display potential reversing agents in preventing multidrug resistances towards a broad variety of applied cytostatic drugs.

In the present study flavone and chrysin increased the expression of P-gp, MRP-2 and BCRP. By using the fluorescent substrates rhodamine-123 (P-gp), CMFDA (MRP-2) and Hoechst-33342 (BCRP) the transport activity was simultaneously reduced. Both flavonoids led to an increased accumulation of the cytotoxic drug topotecan in Caco-2 cells. Although cytosolic topotecan accumulation was increased, the apoptosis was dose dependently inhibited by flavone and chrysin shown by chromatin condensation. The anti-apoptotic effect was associated with a reduction of caspase-3 and -8 activities as well as a stabilization of cytosolic  $\beta$ -catenin. This stabilization could be responsible for an increased expression of ABC-transporters after translocation of  $\beta$ -catenin into the nucleus. These results indicate that the studied transporters provide transport-independent and apoptosis inhibiting activities.

As an *in vivo* model for investigating the effects of feeding flavone in colorectal carcinogenesis the APC<sup>min/+</sup>-mouse model was chosen. The application of flavone increased number and size of adenomas in the jejunum and ileum. Immunohistochemical analysis revealed an increased P-gp expression in these segments. Concurrently the number of cells, which were undergoing apoptosis and were tested positive on active caspase-3, decreased. The main underlying mechanism for preventing apoptosis by inhibition of the caspase cascade shown *in vitro* was confirmed by this study *in vivo* as well. MRP-2 and BCRP however showed a reduced expression in the small intestine. The transport independent and anti-

apoptotic activity of the tested ABC-transporter seems to be restrained to P-gp in this mouse model.

In conclusion, an increased expression of ABC-transporters, especially of P-gp in intestinal cells, was demonstrated *in vitro* and *in vivo*, which was accompanied by reduced apoptosis. Responsible for this reduction was the caspase-3, which was present even under increased accumulation of cytotoxic drugs.

## 8 Literatur

- [1] Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth B. German cancer statistics 2004. *BMC Cancer* 2010;10:52.
- [2] Liu X, Lazenby AJ, Siegal GP. Signal transduction cross-talk during colorectal tumorigenesis. *Adv Anat Pathol* 2006;13:270–4.
- [3] Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987;328:614–6.
- [4] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–50.
- [5] Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK. Pluripotency redux--advances in stem-cell research. *N. Engl. J. Med.* 2007;357:1469–72.
- [6] Bleeker WA, Hayes VM, Karrenbeld A, Hofstra RM, Hermans J, Buys CC et al. Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 2000;95:2953–7.
- [7] Fukushima T, Takenoshita S. Colorectal carcinogenesis. *Fukushima J Med Sci* 2001;47:1–11.
- [8] Young A, Lyons J, Miller AL, Phan VT, Alarcón IR, McCormick F. Ras signaling and therapies. *Adv. Cancer Res.* 2009;102:1–17.
- [9] Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008;40:383–408.
- [10] Letamendia A, Labbé E, Attisano L. Transcriptional regulation by Smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1:S31-9.
- [11] Winkelmann I, Diehl D, Oesterle D, Daniel H, Wenzel U. The suppression of aberrant crypt multiplicity in colonic tissue of 1,2-dimethylhydrazine-treated

C57BL/6J mice by dietary flavone is associated with an increased expression of Krebs cycle enzymes. *Carcinogenesis* 2007;28:1446–54.

[12] Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet* 1999;353:391–9.

[13] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759–67.

[14] Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer* 2005;5:199–209.

[15] Lieberman D. Progress and challenges in colorectal cancer screening and surveillance. *Gastroenterology* 2010;138:2115–26.

[16] He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004;131:1663–77.

[17] Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr. Biol* 1998;8:181–90.

[18] Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2005;12:364–71.

[19] Wong NACS, Pignatelli M. Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am. J. Pathol* 2002;160:389–401.

[20] Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:4761–6.

[21] Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493–501.

- [22] Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362–6.
- [23] Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84:7735–8.
- [24] Jaiswal AS, Balusu R, Narayan S. Involvement of adenomatous polyposis coli in colorectal tumorigenesis. *Front. Biosci* 2005;10:1118–34.
- [25] Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest* 2002;109:987–91.
- [26] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469–80.
- [27] Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1996;93:7950–4.
- [28] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972;26:239–57.
- [29] Mondello C, Scovassi AI. Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. *Subcell. Biochem* 2010;50:307–23.
- [30] Schultz DR, Harrington WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum* 2003;32:345–69.
- [31] Vermeulen K, van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol* 2005;84:627–39.
- [32] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*;55:178–94.
- [33] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770–6.
- [34] Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell. Mol. Biol. Lett* 2006;11:506–25.

- [35] Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem* 2001;276:46639–46.
- [36] Kang T, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogev N, Jurewicz A et al. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J. Immunol* 2004;173:2976–84.
- [37] Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 1998;9:267–76.
- [38] Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;98:13884–8.
- [39] Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clavé P, Thomsen M, Levade T et al. Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem* 2005;280:19836–42.
- [40] Fan T, Han L, Cong R, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 2005;37:719–27.
- [41] Gerstung M, Eriksson N, Lin J, Vogelstein B, Beerenwinkel N. The temporal order of genetic and pathway alterations in tumorigenesis. *PLoS ONE* 2011;6:e27136.
- [42] Yu J, Zhang L. Apoptosis in human cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2004;16:19–24.
- [43] Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Luinetti O, Rossi M, Cifone MG, Corazza GR. Small bowel enterocyte apoptosis and proliferation are increased in the elderly. *Gerontology* 2002;48:204–8.
- [44] Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell. Sci.* 1994;107 (Pt 12):3569–77.

- [45] Sun Z, Wang X, Wallen R, Deng X, Du X, Hallberg E et al. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 1998;33:415–22.
- [46] Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23:63–75.
- [47] Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2001;276:18563–9.
- [48] Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1762:191–201.
- [49] Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15–6.
- [50] Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805–16.
- [51] Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 2002;277:38915–20.
- [52] Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem. Sci.* 2000;25:1–6.
- [53] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11:265–83.
- [54] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1976;455:152–62.
- [55] Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1990;38:1277–87.

- [56] Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 2001;42:1007–17.
- [57] Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003;22:7468–85.
- [58] Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009;10:218–27.
- [59] Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004;11:918–26.
- [60] Takano M, Yumoto R, Murakami T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol. Ther.* 2006;109:137–61.
- [61] Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 2003;8:411–24.
- [62] Shapiro AB, Ling V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* 1997;250:130–7.
- [63] Sauna ZE, Ambudkar SV. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:2515–20.
- [64] Senior AE, al-Shawi MK, Urbatsch IL. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* 1995;377:285–9.
- [65] van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 1996;87:507–17.
- [66] van Meer G. Cellular lipidomics. *EMBO J.* 2005;24:3159–65.
- [67] Lala P, Ito S, Lingwood CA. Retroviral transfection of Madin-Darby canine kidney cells with human MDR1 results in a major increase in globotriaosylceramide and 10(5)- to 10(6)-fold increased cell sensitivity to verocytotoxin. Role of p-glycoprotein in glycolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 2000;275:6246–51.



- [68] Rosa MF de, Sillence D, Ackerley C, Lingwood C. Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2004;279:7867–76.
- [69] Lavie Y, Cao Ht, Volner A, Lucci A, Han TY, Geffen V et al. Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1997;272:1682–7.
- [70] Nicholson KM, Quinn DM, Kellett GL, Warr JR. Preferential killing of multidrug-resistant KB cells by inhibitors of glucosylceramide synthase. *Br. J. Cancer* 1999;81:423–30.
- [71] Masuda M, Nakai E, Mizutani T. Study of oxidized lipids as endogenous substrates of P-gp (ABCB1). *Drug Metab Lett* 2008;2:238–44.
- [72] Lee W, Torchalski B, Kohistani N, Thévenod F. ABCB1 protects kidney proximal tubule cells against cadmium-induced apoptosis: roles of cadmium and ceramide transport. *Toxicol. Sci* 2011;121:343–56.
- [73] Eckford PDW, Sharom FJ. The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem. J* 2005;389:517–26.
- [74] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650–4.
- [75] Kool M, Haas M de, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997;57:3537–47.
- [76] Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2002;71:537–92.
- [77] Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 1992;17:463–8.

- [78] Nies AT, König J, Cui Y, Brom M, Spring H, Keppler D. Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur. J. Biochem.* 2002;269:1866–76.
- [79] Cole SP, Deeley RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 1998;20:931–40.
- [80] Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 1998;58:5337–9.
- [81] Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95:15665–70.
- [82] Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol. Rev.* 2006;86:1179–236.
- [83] Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003;22:7340–58.
- [84] Januchowski R, Wojtowicz K, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. MDR Gene Expression Analysis of Six Drug-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines. *BioMed Research International* 2013;2013:1–10.
- [85] Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, Ikegami Y, Hayasaka S, Sano K et al. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;288:827–32.
- [86] Chen Z, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren X, Sugimoto Y et al. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res.* 2003;63:4048–54.
- [87] Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.* 2003;278:22644–9.

- [88] Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol. Pharmacol.* 2003;64:610–8.
- [89] Zhang Y, Wang H, Wei L, Li G, Yu J, Gao Y et al. Transcriptional modulation of BCRP gene to reverse multidrug resistance by toremifene in breast adenocarcinoma cells. *Breast Cancer Res. Treat* 2010;123:679–89.
- [90] Katayama K, Masuyama K, Yoshioka S, Hasegawa H, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007;60:789–97.
- [91] Ozvegy C, Litman T, Szakács G, Nagy Z, Bates S, Váradi A et al. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;285:111–7.
- [92] Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 2005;66:2399–407.
- [93] Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology* 2001;12:155–60.
- [94] Kang TB, Liang NC. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 1997;54:1013–8.
- [95] Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer* 1999;35:1517–25.
- [96] Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Göke R. Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Apoptosis* 2005;10:611–7.
- [97] Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003;23:519–34.

- [98] Theodoratou E, Kyle J, Cetnarskyj R, Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R et al. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007;16:684–93.
- [99] Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005;45:287–306.
- [100] Lee CH. Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters. *Methods Mol. Biol.* 2010;596:325–40.
- [101] Morris ME, Zhang S. Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.* 2006;78:2116–30.
- [102] Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000;60:3823–31.
- [103] Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999;38:133–42.
- [104] Boucher D, Blais V, Denault J. Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109:5669–74.
- [105] Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913–7.
- [106] Geng L, Huehls AM, Wagner JM, Huntoon CJ, Karnitz LM. Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil. *PLoS ONE* 2011;6:e28862.
- [107] Wenzel U, Kuntz S, Sousa UJ de, Daniel H. Nitric oxide suppresses apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Int. J. Cancer* 2003;106:666–75.

- [108] Lee D, Kim C, Zhang L, Lee YJ. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2008;75:2020–33.
- [109] Chan L, Chou T, Ding H, Chen P, Chiang F, Kuo P et al. Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1820:1081–91.
- [110] Ren J, Cheng H, Xin WQ, Chen X, Hu K. Induction of apoptosis by 7-piperazinethylchrysin in HCT-116 human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* 2012;28:1719–26.
- [111] Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001;58:931–59.
- [112] Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Gentle C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:219–34.
- [113] Kelly RJ, Robey RW, Chen CC, Draper D, Luchenko V, Barnett D et al. A pharmacodynamic study of the P-glycoprotein antagonist CBT-1® in combination with paclitaxel in solid tumors. *Oncologist* 2012;17:512.
- [114] Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 2001;90:157–77.
- [115] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39:361–98.
- [116] Hendrich AB, Michalak K. Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells. *Curr Drug Targets* 2003;4:23–30.
- [117] Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95:9831–6.

- [118] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979;76:4350–4.
- [119] Thorpe GH, Kricka LJ. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Meth. Enzymol.* 1986;133:331–53.
- [120] McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012;95:454–64.
- [121] Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev* 2011;5:1–12.
- [122] Alvarez AI, Real R, Pérez M, Mendoza G, Prieto JG, Merino G. Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci* 2010;99:598–617.
- [123] Cao J, Chen X, Liang J, Yu X, Xu A, Chan E et al. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of glabridin, an active flavonoid from the root of *Glycyrrhiza glabra*. *Drug Metab. Dispos.* 2007;35:539–53.
- [124] Pulido MM, Molina AJ, Merino G, Mendoza G, Prieto JG, Alvarez AI. Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2006;29:279–87.
- [125] Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem. Pharmacol.* 2000;60:1051–9.
- [126] Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 2000;130:2073S–85S.
- [127] Choi J, Piao Y, Kang KW. Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch. Pharm. Res.* 2011;34:607–13.

- [128] Schaubert J, Svanholm C, Termén S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W et al. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 2003;52:735–41.
- [129] Mitsunaga Y, Takanaga H, Matsuo H, Naito M, Tsuruo T, Ohtani H et al. Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;395:193–201.
- [130] Zhou S. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008;38:802–32.
- [131] Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr. Med. Chem.* 2012;19:1946–2025.
- [132] Gao S, Hu M. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini Rev Med Chem* 2010;10:550–67.
- [133] Jaganathan SK. Can flavonoids from honey alter multidrug resistance? *Med. Hypotheses* 2011;76:535–7.
- [134] Lohner K, Schnäbele K, Daniel H, Oesterle D, Rechkemmer G, Göttlicher M et al. Flavonoids alter P-gp expression in intestinal epithelial cells in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:293–300.
- [135] Nishiumi S, Miyamoto S, Kawabata K, Ohnishi K, Mukai R, Murakami A et al. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:1332–62.
- [136] Izuta H, Shimazawa M, Tazawa S, Araki Y, Mishima S, Hara H. Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56:8944–53.
- [137] Serra A, Macià A, Romero M, Valls J, Bladé C, Arola L et al. Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models. *Br. J. Nutr.* 2010;103:944–52.

- [138] Sergent T, Garsou S, Schaut A, Saeger S de, Pussemier L, van Peteghem C et al. Differential modulation of ochratoxin A absorption across Caco-2 cells by dietary polyphenols, used at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Lett.* 2005;159:60–70.
- [139] Choi J, Choi H, Shin S. Enhanced bioavailability of paclitaxel after oral coadministration with flavone in rats. *Int J Pharm* 2004;275:165–70.
- [140] Wong JMW, Souza R de, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006;40:235–43.
- [141] Gaschott T, Werz O, Steinmeyer A, Steinhilber D, Stein J. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is mediated by vitamin D receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;288:690–6.
- [142] Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145:5439–47.
- [143] Khan MS, Halagowder D, Devaraj SN. Methylated chrysin induces co-ordinated attenuation of the canonical Wnt and NF- $\kappa$ B signaling pathway and upregulates apoptotic gene expression in the early hepatocarcinogenesis rat model. *Chem. Biol. Interact.* 2011;193:12–21.
- [144] Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 2000;351:95–105.
- [145] Zhu D, Hensel J, Hilgraf R, Abbasian M, Pornillos O, Deyanat-Yazdi G et al. Inhibition of protein kinase CK2 expression and activity blocks tumor cell growth. *Mol. Cell. Biochem.* 2010;333:159–67.
- [146] Gómez-Martínez A, García-Morales P, Carrato A, Castro-Galache MD, Soto JL, Carrasco-García E et al. Post-transcriptional regulation of P-glycoprotein expression in cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.* 2007;5:641–53.



- [147] Tainton KM, Smyth MJ, Jackson JT, Tanner JE, Cerruti L, Jane SM et al. Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase-activation in the absence of ATP-dependent drug efflux. *Cell Death Differ* 2004;11:1028–37.
- [148] Dudeja V, Mujumdar N, Phillips P, Chugh R, Borja-Cacho D, Dawra RK et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. *Gastroenterology* 2009;136:1772–82.
- [149] Kim R, Emi M, Tanabe K. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006;57:545–53.
- [150] Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004;23:2881–90.
- [151] Schmid K, Haslbeck M, Buchner J, Somoza V. Induction of heat shock proteins and the proteasome system by casein-N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)lysine in Caco-2 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2008;1126:257–61.
- [152] Smyth MJ, Krasoversuskis E, Sutton VR, Johnstone RW. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95:7024–9.
- [153] Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase-activation during apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2000;2:318–25.
- [154] Robinson LJ, Roberts WK, Ling TT, Lamming D, Sternberg SS, Roepe PD. Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry* 1997;36:11169–78.
- [155] Schumacher M, Hautzinger A, Rossmann A, Holzhauser S, Popovic D, Hertrampf A et al. Chrysin blocks topotecan-induced apoptosis in Caco-2 cells in spite of inhibition of ABC-transporters. *Biochem. Pharmacol.* 2010;80:471–9.
- [156] Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci.* 2008;99:631–7.

- [157] Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J. Cell. Biochem.* 2007;102:820–8.
- [158] Steinhusen U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dörken B et al. Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.* 2000;275:16345–53.
- [159] Lim JC, Kania KD, Wijesuriya H, Chawla S, Sethi JK, Pulaski L et al. Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J. Neurochem* 2008;106:1855–65.
- [160] Kirkland SC. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 2009;101:320–6.
- [161] Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A et al. Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 2001;61:3465–71.
- [162] Vincan E, Leet CS, Reyes NI, Dilley RJ, Thomas RJ, Phillips WA. Sodium butyrate-induced differentiation of human LIM2537 colon cancer cells decreases GSK-3 $\beta$  activity and increases levels of both membrane-bound and Apc/axin/GSK-3 $\beta$  complex-associated pools of beta-catenin. *Oncol. Res.* 2000;12:193–201.
- [163] Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991;66:85–94.
- [164] Murthy NS, Mukherjee S, Ray G, Ray A. Dietary factors and cancer chemoprevention: an overview of obesity-related malignancies. *J Postgrad Med* 2009;55:45–54.
- [165] Pan M, Ho C. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem Soc Rev* 2008;37:2558–74.
- [166] Oyama T, Yasui Y, Sugie S, Koketsu M, Watanabe K, Tanaka T. Dietary tricin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2:1031–8.

- [167] Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992;256:668–70.
- [168] Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990;247:322–4.
- [169] Cai H, Sale S, Schmid R, Britton RG, Brown K, Steward WP et al. Flavones as colorectal cancer chemopreventive agents--phenol-o-methylation enhances efficacy. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2:743–50.
- [170] Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999;20:1945–52.
- [171] Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 2001;68:921–31.
- [172] Munding J, Ziebarth W, Pox CP, Ladigan S, Reiser M, Hüppe D et al. The influence of 5-aminosalicylic acid on the progression of colorectal adenomas via the  $\beta$ -catenin signaling pathway. *Carcinogenesis* 2012;33:637–43.
- [173] Au A, Li B, Wang W, Roy H, Koehler K, Birt D. Effect of dietary apigenin on colonic ornithine decarboxylase activity, aberrant crypt foci formation, and tumorigenesis in different experimental models. *Nutr Cancer* 2006;54:243–51.
- [174] Lambert JD, Kwon S, Ju J, Bose M, Lee M, Hong J et al. Effect of genistein on the bioavailability and intestinal cancer chemopreventive activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Carcinogenesis* 2008;29:2019–24.
- [175] Yamada T, Mori Y, Hayashi R, Takada M, Ino Y, Naishiro Y et al. Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 2003;63:895-901.
- [176] Dietrich CG, Vehr A, Martin IV, Gassler N, Rath T, Roeb E et al. Downregulation of breast cancer resistance protein in colon adenomas reduces

cellular xenobiotic resistance and leads to accumulation of a food-derived carcinogen. *Int. J. Cancer* 2011;129:546–52.

[177] Rost D, Mahner S, Sugiyama Y, Stremmel W. Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002;282:G720-6.

[178] Akao T, Sakashita Y, Hanada M, Goto H, Shimada Y, Terasawa K. Enteric excretion of baicalein, a flavone of *Scutellariae Radix*, via glucuronidation in rat: involvement of multidrug resistance-associated protein 2. *Pharm. Res.* 2004;21:2120–6.

[179] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79:727–47.

[180] Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic. Res.* 2004;38:771–85.

[181] Winkelmann I, Diehl D, Oesterle D, Daniel H, Wenzel U. Flavone induces changes in intermediary metabolism that prevent microadenoma formation in colonic tissue of carcinogen-treated mice. *Mol Nutr Food Res* 2010;54 Suppl 2:S184-95.

[182] Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y et al. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2000;82:1689–93.

[183] Kwong LN, Dove WF. APC and its modifiers in colon cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009;656:85–106.

[184] Benchabane H, Ahmed Y. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009;656:75-84.

[185] Preston SL, Leedham SJ, Oukrif D, Deheregodla M, Goodlad RA, Poulsom R et al. The development of duodenal microadenomas in FAP patients: the human correlate of the Min mouse. *J. Pathol.* 2008;214:294–301.

[186] Luo F, Brooks DG, Ye H, Hamoudi R, Poulogiannis G, Patek CE et al. Mutated K-ras(Asp12) promotes tumourigenesis in Apc(Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *Int J Exp Pathol* 2009;90:558–74.

## 9 Anhang

### A.1 Materialien

#### A.1.1 Chemikalien

Tab. 9.1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4 Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe, D
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, D
2-Methyl-1-propanol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Acrylamidlösung, 30%	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe, D
BioRad Protein Assay	BioRad, München, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Bovines Serumalbumin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dulbeccos Phosphatpuffer, ohne $\text{Ca}^{2+}$ , ohne $\text{Mg}^{2+}$	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, D
EnzChek Caspase-3 Assay Kit # 1	Invitrogen, Karlsruhe, D
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Flavon	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Fötales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, D
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hoechst-33342	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Hühnereiweiß-Glycerin	Division Chroma, Münster, D
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchloridhexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver	Heirler, Radolfzell, D
Myrj 53	Sigma Aldrich, Steinheim, D
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdesoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Nichtessentielle Aminosäuren (Gly, L-Ala, L-Asn, L-Asp, Glu, L-Pro, L-Ser)	Invitrogen, Karlsruhe, D

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
NNN´N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Nonidet	Sigma Aldrich, Steinheim, D
p-Hydroxycoumarsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, D
p-Formaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Polyvinyl-Eindeckelmedium	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Proteaseinhibitorcocktail (Aprotinin, Bestatin, Leupeptin, E-64, Pepstatin-A; PIC)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Sytox Green	Invitrogen, Karlsruhe, D
Topotecan	Molekula, Lisses, F
Trypan Blau	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, D

## A.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. 9.2: Verwendete Puffer und Lösungen

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Konzentration</b>
<u>Blotpuffer nach Towbin (pH 8,6)</u>	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20% (v/v)
<u>Citratpuffer (pH6,0)</u>	
Zitronensäure	1,8 mM
Natriumcitrat	8,2 mM
Tween 20 (in Aqua bidest. RT)	0,1% (v/v)
<u>DEA-Puffer (pH 9,8)</u>	
DEA	1 M
Magnesiumchlorid (in Aqua bidest., RT)	0,5 mM
<u>Enhanced chemiluminescence (ECL) Lösung</u>	
a) <u>Luminollösung</u>	
Tris (pH 8,6)	0,1 M
Luminol	1,25 mM
Wasserstoffperoxid (in Aqua bidest., -20 °C)	0,031% (v/v)
b) <u>Enhancerlösung</u>	
p-Hydroxycoumarsäure (in DMSO, RT)	67 µM

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Konzentration</b>
<u><i>Krebspuffer</i></u>	
Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	5,4 mM
Calciumchlorid	2,8 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
Glukose	10 mM
HEPES	10 mM
<u><i>Lämmli-puffer (dreifach konzentriert)</i></u>	
SDS	5% (w/v)
β-Mercaptoethanol	5% (v/v)
Tris (pH 6,8)	150 mM
Glycerin	30% (v/v)
Bromphenolblau	Spatelspitze
(in Aqua bidest., -20 °C)	
<u><i>Laufpuffer</i></u>	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)
(in Aqua bidest., 4 °C)	
<u><i>Lysepuffer</i></u>	
HEPES (pH 7,5)	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PIC	0,2% (v/v)
(in Aqua bidest., -20 °C; DTT und PIC werden unmittelbar vor Gebrauch zugegeben)	
<u><i>Membranpuffer</i></u>	
HEPES (pH 7,5)	10 mM
Glycerin	10% (v/v)
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PIC	0,2% (v/v)
(in Aqua bidest., -20 °C; DTT und PIC werden unmittelbar vor Gebrauch zugegeben)	
<u><i>RIPA-Puffer</i></u>	
Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
Natriumchlorid	150 mM
Nonidet	1% (v/v)
Natriumdesoxycholat	0,5% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)
PIC	0,2% (v/v)
(in Aqua bidest., RT)	
<u><i>Strippuffer</i></u>	
Tris (pH 6,8)	62 mM
SDS	2% (w/v)
DTT	100 mM
(in Aqua bidest., RT; DTT wird unmittelbar vor Gebrauch zugegeben)	



<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Konzentration</b>
<u>TBS (Tris buffered saline, pH 7,5)</u>	
Natriumchlorid	150 mM
Tris (in Aqua bidest., RT)	50 mM
<u>TBS-T (TBS-Tween 20, pH 7,5)</u>	
Natriumchlorid	150 mM
Tris	50 mM
Tween 20 (in Aqua bidest., RT)	0,05% (v/v)

### A.1.3 Geräte

Tab. 9.3: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank Galaxy, B	RS-Biotech, Wiesbaden, D
Elektrophorese Komplettsystem Mini-Protean3 Cell	BioRad, München, D
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2	Zeiss, Wetzlar, D
Glas-Teflon-Homogenisator	Kontes Glass Co., Vineland N.J., USA
Homogenisator Typ RW 18	Janke & Kunkel KG, Staufen in Breislau, D
Kamera (Fluoreszenzmikroskop)	Intas, Göttingen, D
Konfokalmikroskop DMIBRE	Leica, Wetzlar, D
Laborpumpe Mini	Neolab, Heidelberg, D
Mikrowellenschnellkochtopf	Nordic Ware, Minneapolis, USA
Mikrotiterplatten-Reader Fluoroskan	Thermo Electron, Dreieich, D
Optimax X-Ray Film Processor	Protec Medizintechnik, Obersteinfeld, D
PAP-Pen	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Rotationsmikrotom 2030 Biocut	Reichert-Jung, Wien, A
Plattenschüttler	Heidolph, Schwalbach, D
Powersupply E861	Consort, Turnout, B
Semidry Blotter Modell HEP 1	Owl, Portsmouth, USA
Sicherheitswerkbank Herasafe HS 12/2	Heraeus instruments, Berlin, D
Spektralphotometer U-2001	Hitachi Ltd., Tokyo, J
Trockenschrank	Heraeus instruments, Berlin, D
Wasseraufbereitungssystem Synergy	Millipore, Schwalbach, D
Zentrifuge Mikro 120	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge RC 5 B Plus	Sorvall, New York, USA
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen, D

### A.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 9.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe, D
Einwegpipetten (1, 2, 5, 10 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einwegpipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einwegreaktionsgefäße (1,5, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Hyperfilm TM ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Kunststoffeinwegküvetten (Halbmikro)	Carl Roth, Karlsruhe, D

---

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, D
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach, D
Quadriperm	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Röhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Whatman-Filterpapier (20 x 20 cm)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Zellkultur Multiwellplatte (6-, 24-, 48-, 96-well)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Zellschaber	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH

---